

Nahinfrarotspektroskopische Untersuchungen an festen Arzneiformen-

Ansätze zur Reduktion des Kalibrieraufwands

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Daphny Kamiński
aus Gifhorn

1. Referent:	Professor Dr. Knut Baumann
2. Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
eingereicht am:	25.02.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am:	01.07.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

1. D. Kaminski, K. Baumann, *An approach to a NIR-model for selected substances of the GPHF-MINILAB[®]*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2009 in Jena.
2. D. Kaminski, K. Baumann, *Differentiation of several identically prepared batches of tablets using near infrared spectroscopy*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2012 in Greifswald.

Danksagung

Nach mehreren Jahren Arbeit liegt sie nun vor, meine Dissertation. Darum möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich am Institut über all die Zeit begleitet und unterstützt haben. Zu aller erst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Knut Baumann für die Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten in seinem Arbeitskreis danken. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig für die Übernahme des Koreferats. Ohne ihren wertvollen akademischen Rat wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie bedanken. Im speziellen gilt mein Dank meinen Arbeitskreiskolleginnen Dr. Stephanie Ludewig und Janina Nolte für die fachliche Unterstützung und angeregte Diskussionen. Aber auch bei Dr. Sandra Grotefend und Dr. Sabine Redweik, genauso wie bei dem Rest des Arbeitskreises um Prof. Dr. Hermann Wätzig und bei Dr. Burmeister bedanke ich mich für die tiefgründigen Diskussionen in Raum 161.

Dr. Lorke, Dr. Nadine Oehninger, Dr. Hannes Falke, Frau Lucka, Frau Isedor und Staats möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Bereuung des 5. Fachsemesters danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei dem pharmazeutischen Großhandel Richard Kehr GmbH für die Beschaffung von Proben und beim Institut für Pharmazeutische Technologie, insbesondere bei Frau Jahn, für die Unterstützung bei der Probenproduktion bedanken.

Allen Wahlpflichtfachstudenten/-innen, aber besonders Franziska Grunert und Kristin Schattmann danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz, den sie im Rahmen ihres Wahlpflichtfachs und als wissenschaftliche Hilfskräfte geleistet haben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank natürlich meiner großartigen Familie. Vor allem meinem Ehemann, der mir als Partner aber auch als Kollege sehr viel Verständnis und Motivation entgegenbringt und bei allen Erfolgen und Misserfolgen als Stütze an

meiner Seite ist. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich auf all meinen Ausbildungsabschnitten gefördert haben.

Auch meiner Mutter und meinen Schwiegereltern, die unsere Familie tatkräftig unterstützen, indem sie mir immer wieder Freiräume schaffen, um die Promotion zu vollenden, gilt mein Dank. Meiner kleinen Schwester danke ich für all die motivierenden Gespräche und meinem Sohn Jan für seine zauberhafte Art auf der Tastatur neben mir eine Dissertation über Johannisbeeren zu verfassen.

Für meinen Papa

Abkürzungen

ALS	alternating least squares
AOTF	Acousto Optic Tunable Filter (akusto-optischer Kristall)
API	Active Pharmaceutical Ingredient (Wirkstoff)
AUC	Area under the Curve
DAD	Diode Array Detector
DC	Dünnschichtchromatographie
DPhG	Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft
EFA	Evolving Factor Analysis
ETVM	erweiterte totale Variabilitätsmatrix
FDA	Food and Drug Administration
FT	Fourier-Transformation
GPHF	Global Pharma Health Fund
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
LOO-CV	“Leave-one-out“-Kreuzvalidierung
NIR	Nahes Infrarot
NIRS	Nah Infrarot Spektroskopie
MCC	mikrokristalline Cellulose
MCR	Multivariate Curve Resolution
MIR	Mittleres Infrarot
MSC	Multiplicative Scatter Correction
OOS	Out Of Specification
PC	Principal Component (Hauptkomponente)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PLS	Partial Least Squares
PRESS	predictive residual sum of squares

RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
RP-Phase	Reversed Phase (Umkehrphase)
RSD%	Relative Standard Deviation [%]
RPVM	reduzierte Prozessvariabilitätsmatrix
SNV	standard normal variate
SST	System Suitability Test
SVD	Singular value decomposition (Singulärwertzerlegung)
t_R	Retentionszeit
UV/VIS	Ultra Violett / Visible (Sichtbar)

Mathematische Notation

Nachfolgend werden Skalare (x) in kursiven Kleinbuchstaben dargestellt. Vektoren werden immer als Spaltenvektoren (\mathbf{x}) mit fetten Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Wird ein Vektor \mathbf{x} transponiert, so wird diese Form als \mathbf{x}^T beschrieben. Matrizen (\mathbf{X}) werden immer als fette Großbuschstaben angegeben. Ihre Dimension lässt sich über die Anzahl n Zeilen und m Spalten darstellen, wobei die i -te Spalte der Matrix \mathbf{X} der Vektor \mathbf{x}_i bildet.

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Abkürzungen.....	vi
Mathematische Notation	viii
Inhaltsverzeichnis	ix
I. Einleitung und theoretische Grundlagen	1
1. Einleitung.....	1
2. Nahinfrarotspektrometrie	3
2.1. NIR-Messmethoden.....	5
2.2. Aufbau eines Nahinfrarotspektrometers	8
2.3. Michelson-Interferometer.....	9
2.4. Polarisationsinterferometer.....	10
2.5. Detektor	11
3. Orthogonale Verfahren	11
3.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	11
3.2. Potentiometrische Titration.....	13
4. Multivariate Datenanalyse	14
4.1. Datenvorbehandlung	14
4.1.1. Normierung	15
4.1.2. Ableitung.....	16
4.1.3. Korrektur von Streueffekten	17
4.1.3.1. MSC	17
4.1.3.2 Standardisierung von Spektren (SNV).....	18
4.2. Hauptkomponentenanalyse	18
4.3. Multivariate Regression	21
4.4. Lineare Diskriminanzanalyse.....	23
4.5. Validierung	25
4.6 MCR-ALS	28
5. Methoden zur Reduktion des Kalibrationsaufwands nach Blanco.....	31
6. Stabilitätsuntersuchungen nach ICH Q1A (R2)	35

II. Experimenteller Teil.....	36
7. Wirkstoffvorhersage aus Tablettenspektren	36
7.1. Zweikomponentengemisch	37
7.1.1. Proben	37
7.1.2. Spektren	38
7.1.3. Ergebnisse	38
7.2 Ibuprofen-Tabletten	41
7.2.1 Proben	41
7.2.2 Spektren	41
7.2.3 Ergebnisse	42
7.3 Ramipril-Tabletten	44
7.3.1 Proben	44
7.3.2 Spektren	45
7.3.3 Ergebnisse	46
7.4 Zusammenfassung	48
8. Alterung von Antibiotika-Tabletten	49
8.1 Projektplanung.....	50
8.1.1 Prüfparameter	50
8.1.2 Proben	50
8.1.3 Lagerbedingungen und Probenzug.....	50
8.2 Versuchsdurchführung	51
8.2.1 Versuchsdurchführung NIR.....	51
8.2.2 Versuchsdurchführung HPLC	52
8.3 Auswertung und Ergebnisse.....	53
8.3.1 Rohdaten (Aussehen, Geruch, Masse).....	53
8.3.2 Rohdaten NIR	54
8.3.3 HPLC-Kalibration	56
8.3.4 HPLC-Proben	59
8.3.5 NIR-Auswertung	62
8.3.6 Zusammenfassung	71

9. Klassifikation von Chargen	72
9.1. Proben	73
9.2. Prüfparameter	76
9.3. Versuchsdurchführung	76
9.4. Auswertung und Ergebnisse	88
III. Zusammenfassung	97
10. Zusammenfassung der Arbeit.....	97
IV. Anhang.....	99
11. Instrumentierung und Software	99
11.1 Nahinfrarotspektrometrie	99
11.2 Orthogonale Methoden	100
11.3 Pharmazeutische Technologie	101
12. Reagenzien	102
13. Literatur	103
14. Lebenslauf	109

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

1. Einleitung

Die Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) zählt genauso wie die UV-VIS- und IR-Spektroskopie zu den spektroskopischen Methoden. Sie stellt eine anerkannte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von organischen Substanzen dar. Vor allem in den letzten zwei Jahrzehnten ist die Bedeutung dieser analytischen Methode für die Bereiche Prozesskontrolle und Produktionsüberwachung enorm angestiegen.

Die Infrarot-Strahlung wurde bereits im Jahr 1800 von Sir William Herschel entdeckt. Er konnte mit Hilfe eines Thermometers und eines Prismas zeigen, dass sich an das rote Ende des sichtbaren Licht eine unsichtbare Region anschließt, die Wärme erzeugt [2]. Allerdings dauerte es noch bis 1912 bis quantitative NIR-Messungen zur Bestimmung von atmosphärischem Wasserdampf von F. E. Fowle des Mount Wilson Observatory durchgeführt wurden [3]. Erst mit der voranschreitenden digitalen Revolution und somit der Möglichkeit zur Entwicklung computergestützter Methoden für die Auswertung der NIR-Spektren, erlangte diese Messtechnik mehr Bedeutung [3]. Durch die Kombination von multivariaten Auswertmethoden mit leistungsfähigeren Computern wurde in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts der Grundstein für ein breites Anwendungsgebiet der NIRS gelegt. Auf dem Gebiet der Pharmazeutischen Analytik konnte sich die NIRS allerdings noch nicht richtig etablieren, denn die zuständigen Behörden zweifelten zuerst an der Robustheit der Methode [1]. Durch die 1993 von Plugge et al. veröffentlichte Validierungsstudie zur Identifizierung und Quantifizierung des Wirkstoffs und Wassers bei Ampicillin-Trihydrat konnte gezeigt werden, dass die NIRS eine echte Alternative zu den üblicherweise genutzten analytischen Methoden in der pharmazeutischen Analytik darstellt [4].

In den letzten 20 Jahren wurde das Einsatzgebiet der NIRS stark erweitert [5]. Eine Übersicht bietet Tabelle 1.1. Trotz der vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten der NIRS hat diese Technik es noch nicht geschafft, die von den Behörden zugelassenen und etablierten Methoden zu verdrängen. Durch die Aufnahme in das Europäische Arzneibuch (Kapitel 2.2.40) und in das Amerikanische Arzneibuch (USP 29 Kapitel

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

1119) wurden die Anforderungen, die an die Methode gestellt werden spezifiziert. Um bei der Arzneimittelherstellung eine Routineanalytik gegen eine NIRS-Analytik austauschen zu können, müssen die vorhandenen Daten zuerst hinsichtlich Richtigkeit, Präzision, Linearität, Spezifität, Empfindlichkeit und Robustheit überprüft werden. Dieser Zeit- und Kostenaufwand wird noch häufig von der pharmazeutischen Industrie gescheut, denn die regulatorischen Anforderungen sind hier wesentlich strenger als in anderen Bereichen [6].

Tab. 1.1: Einsatz der NIRS in der Pharmazie und weiteren Bereichen nach [1]

Anwendungen der NIRS in der Pharmazie/weitere Bereiche
Pharmazie
Identitäts-, Gehalts- und Feuchtigkeitsbestimmung von Pulvern, Granulaten und Tabletten, Restfeuchte in Lyophilisaten, Feuchte in Gelatine-Kapseln, Kristallinitätsgrad, Polymorphie, Dichte, Modifikationsumwandlungen, Härtegrad von Tabletten, Stabilität, Korngröße und Mischgüte. Online-Monitoring: Mischen, Granulieren, Trocknen, Filmcoating, Direktpelletierung
Chemie
Zusammensetzung, Struktur, Wassergehalt von organischen Verbindungen, Charakterisierung von synthetischen Polymeren, Additive in Polymeren.
Landwirtschaft
Protein, Wasser, Fett, Öl, Asche in Weizen, Reis, Sojabohnen, Saatgut.
Nahrungsmittelindustrie
Protein, Wasser, Fett in Backwaren, Molkereiprodukten, Fleisch, Kakao, Schokolade
Medizin
Nichtinvasive in-vivo Bestimmung von Körperfett, Cholesterol, Blutzucker, Sauerstoff, Wassergehalt der Haut, Hautkrebs, Fett, Kohlenhydrate und Stickstoff in Fäzes
Umweltschutz
Kunststoff-Recycling, Schadgasmessungen, Sedimente (saurer Regen)

Die vorliegende Arbeit zeigt Ansätze, die es möglich machen sollen den Zeit- und Kostenaufwand für NIR-Kalibrationen zu reduzieren. Weiterhin soll gezeigt werden, ob eine sichere Auswertung der NIRS-Daten unabhängig von zurzeit nötigen orthogonalen Methoden einfach entwickelt werden kann.

2. Nahinfrarotspektrometrie

Der Nahinfrarot-Bereich wird im elektromagnetischen Spektrum umrahmt von dem sichtbaren Bereich (VIS) und dem mittleren Infrarotbereich. Wie in Abb. 2.1 dargestellt, erstreckt sich der kurzwellige Teil der Infrarotstrahlung von ca. 800 bis 2500 nm. Der Zusammenhang von Wellenlänge λ und Wellenzahl $\tilde{\nu}$ erfolgt über Gl. 2.1.

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Die verwendete Einheit der Wellenzahl ist cm^{-1} .

Wellenlänge λ								
< 0,01 nm	0,01-1 nm	100-400 nm	400-800 nm	0,8-2,5 μm	2,5-50 μm	50-500 μm	500 μm -30 cm	> 0,1 m
γ -Strahlen	Röntgenstrahlen	Ultraviolett (UV)	Sichtbarer Bereich (Vis)	Nahes Infrarot (NIR)	Mittleres Infrarot (MIR)	Fernes Infrarot (FIR)	Mikrowellen (MW)	Radiowellen
Wellenzahl $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]				12500-4000	4000-200	200-20		

Abb. 2.1: Das Spektrum der elektromagnetischen Wellen [7].

Nach Plank, Bohr und Einstein ist die Energie E eines Lichtquants durch folgende Gleichung gegeben [7]:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

ν = Frequenz; h = Planck'sche Konstante; c = Ausbreitungsgeschwindigkeit

Aus dieser Gleichung lässt sich folgern, dass die Wellenzahl zur absorbierten Strahlung und daher auch zur Energie proportional ist.

Absorbieren Moleküle elektromagnetische Strahlung, findet je nach Wellenlänge somit eine Anregung des Elektronensystems oder sogar Ionisation statt.

Eine Ionisation wird meist durch sehr energiereiche Strahlung wie z.B. die γ -Strahlung erreicht. Absorptionsspektren des UV- und VIS-Bereichs dagegen entstehen durch Anregung der Elektronen innerhalb der Moleküle. Sowohl bei der NIR-Spektroskopie als auch bei der MIR-Spektroskopie werden Moleküle zu Schwingungen angeregt und somit ein Absorptionsspektrum erzeugt. Für die Rotation von Molekülen genügt die Energie des Mikrowellenspektrums [7].

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Bei Molekülschwingungen unterscheidet man Valenz- und Deformationsschwingungen.

Die Valenzschwingungen werden auch „Streckschwingungen“ genannt, weil dabei der Abstand der einzelnen Atome längs der Bindungsachse vergrößert und wieder verkleinert wird. Bei den Deformationsschwingungen, die auch „Biegeschwingungen“ genannt werden, kommt es zu einer Veränderung des Bindungswinkels der im Molekül gebundenen Atome [7]. Für die Erzeugung von Valenzschwingungen wird eine höhere Energie benötigt als für die Deformationsschwingungen [7].

Eine schwingende Atomgruppe in einem organischen Molekül kann über das Modell eines anharmonischen Oszillators beschrieben werden. Hierbei ist festgelegt, dass eine chemische Bindung nur begrenzt dehnbar ist. Wird eine bestimmte Dehnung überschritten, tritt ein Bruch ein. Außerdem können, der Quantentheorie zu Folge, schwingungsfähige Gruppen nur diskrete Energiezustände einnehmen. Diese werden durch die Schwingungsquantenzahl $v = 0, 1, 2, 3$ usw. gekennzeichnet [7].

Da ein molekularer Oszillator nicht nur die Grundenergie, sondern auch bestimmte Vielfache dieser Energie aufnehmen kann, existieren auch sogenannte Oberschwingungen oder Obertöne. Neben Grund- und Obertonschwingung können auch Kombinationen aus verschiedenen Einzelschwingungen auftreten, die Kombinationsschwingung genannt werden. Die Absorptionsbanden solcher Schwingungen sind jedoch weniger stark ausgeprägt, als die einer Grundschiwingung, da die Wahrscheinlichkeit für solche Schwingungen auch geringer ist.

Anders als im MIR finden sich im NIR zumeist nur Absorptionsbanden, die aus Oberton- und Kombinationsschwingungen bestehen. Abb. 2.2 macht deutlich, dass sich diese Banden häufig stark überlappen. Dadurch ist die Spezifität dieser Methode deutlich geringer, als die der MIR-Spektroskopie [3], weshalb eine Interpretation nicht ohne weiteres möglich ist.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

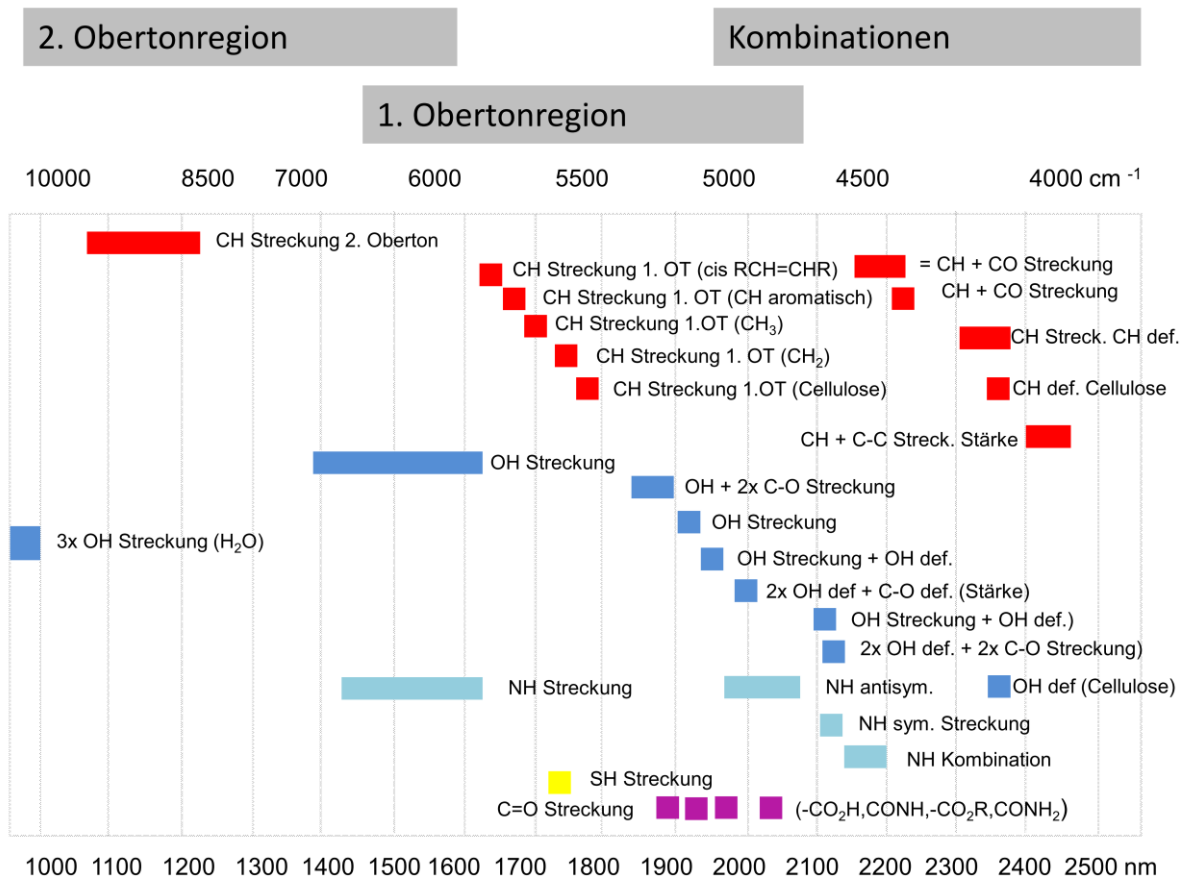


Abb. 2.2: Überblick über die NIR-Absorptionsbanden zusammengestellt nach [8].

Erst die Entwicklung chemometrischer Methoden und die Möglichkeit Proben trotz der geringen Intensität der Absorptionsbanden ohne Probenvorbereitung vermessen zu können, hat zu einem Durchbruch der NIR-Messtechnik geführt [3].

2.1. NIR-Messmethoden

In der NIRS können alle Arten von Proben vermessen werden. Dazu werden verschiedene Messarten genutzt. In Abhängigkeit von dem vorliegenden Problem stehen nach Abb. 2.3 vier verschiedene Messarten zur Verfügung, die durch verschiedenartige Module auf einem Basisgerät verwendet werden können.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

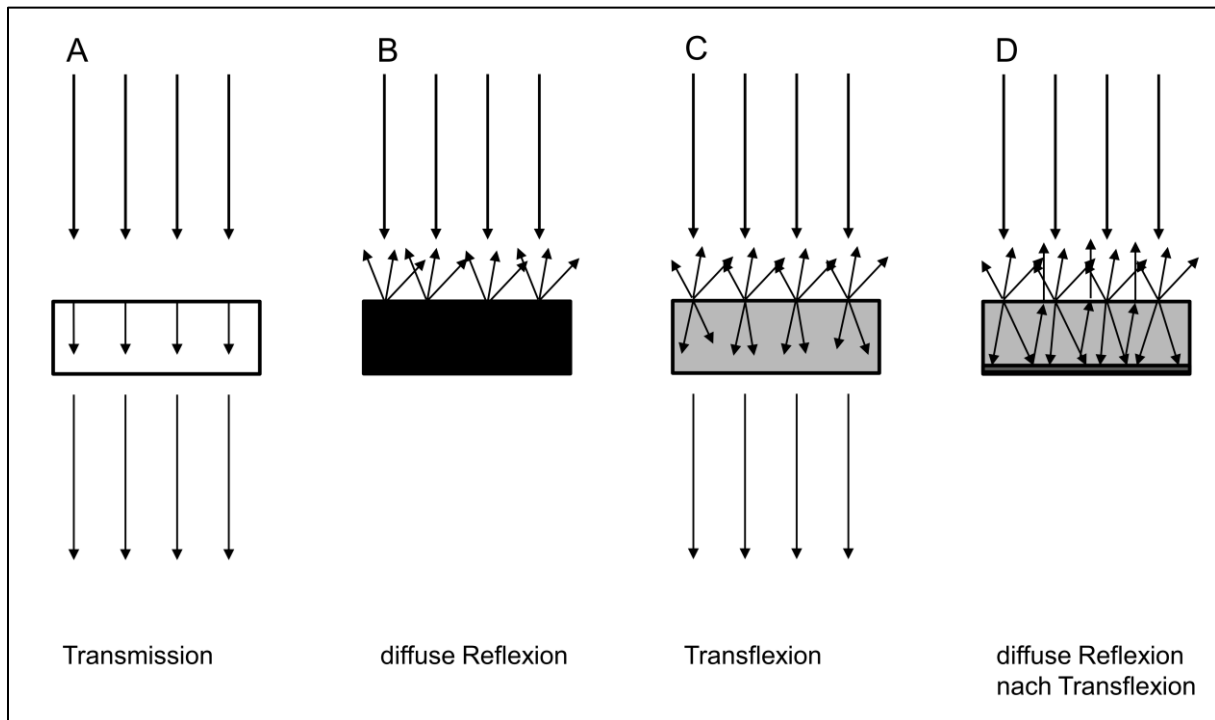


Abb. 2.3: Die vier verschiedenen Messarten der NIRS. Entsprechend der vorliegenden Probensituation kann hier die geeignete Methode ausgewählt werden. A stellt eine klare Lösung dar; B zeigt einen festen Körper; C und D bilden mitteldicht Körper, wie z.B. Suspensionen ab; modifiziert nach [9]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint®

Die Transmission (Abb. 2.3 A) stellt die optimale Methode zur Vermessung von Flüssigkeiten dar. Hierbei gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Die Absorption A ist das Produkt aus dem molaren Absorptionskoeffizienten ε , der Konzentration c und der Schichtdicke d . Sie steht mit der Transmission T in folgendem Zusammenhang:

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Die diffuse Reflexion (Abb. 2.3 B) wird für die Untersuchung von pulverförmigen Proben, aber auch von Granulaten, Gelen, Pasten und festen Proben, wie zum Beispiel Tabletten, eingesetzt. Die NIR-Strahlung trifft auf die Oberfläche der Partikel. Ein Teil der Strahlung wird absorbiert ein anderer Teil der Strahlung wird ohne eine bestimmte Vorzugsrichtung reflektiert. Die reflektierte Strahlung enthält die spektralen Informationen. Die Eindringtiefe der NIR-Strahlung in feste Proben variiert,

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

daher ist ein Abgleich gegen einen Weißstandard zwingend nötig. Das bekannteste Modell, das die diffuse Reflexion beschreibt, wurde von Kubelka und Munk [10] entwickelt.

$$R = I/I_0 \quad (\text{Gl. 2.5})$$

R: Reflexion

I_0 : monochromatischer Lichtstrahl

I: nach Probendurchgang vorhandene Lichtintensität

$$f(R'_\infty) = \frac{(1-R'_\infty)^2}{2R'_\infty} = \frac{K}{S} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

R'_∞ : relatives Reflexionsvermögen einer Probe

K: Absorptionsmodul der Probe

S: Streumodul der Probe

Die Transflexion (Abb. 2.3 D) wird vor allem für die Vermessung von Flüssigkeiten verwendet. Unter dem Begriff Transflexion wird im speziellen die diffuse Reflexion nach Transflexion an einer geeigneten reflektierenden Oberfläche verstanden. Dabei durchdringt die Strahlung die Probe, wird reflektiert und durchstrahlt die Probe ein weiteres Mal, bevor die Strahlung detektiert wird. Dieses Verfahren wird bei Messungen mit einer sogenannten Einstichsonde verwendet. Damit lässt sich beispielsweise die Qualität von Rohstoffen direkt in der Ausgangsverpackung überprüfen.

Die diffuse Transmission wird für die Vermessung von festen Proben, wie z.B. Tabletten oder Pulvern verwendet. Die Strahlung durchdringt die Probe vollständig. Die durchgelassene Strahlung wird an den Teilchen der Probe reflektiert und die spektrale Information der Probe detektiert. Dies ermöglicht einen spektralen Querschnitt der gesamten Proben. Diese Ausführung legt dar, dass die NIRS vielseitig verwendet werden kann. Eine Übersicht über Vor- und Nachteile dieser Methode finden sich in Tab. 2.1.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Tab. 2.1: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der NIR-Technik

Vorteile NIR	Nachteile NIR
<ul style="list-style-type: none">- Vielseitig- Keine Probenvorbereitung- Messung direkt im Gebinde- Chemische und physikalische Kenngrößen messbar- Einsatz großer Probenmengen/ Schichtdicke möglich- Empfindlich gegen jegliche quantitative Probenänderung	<ul style="list-style-type: none">- Dunkle Substanzen absorbieren- Glänzende Proben problematisch- Keine Methode zur Spurenanalytik- Immer orthogonale Methode für Gehaltsbestimmung nötig- Jede erstellte Kalibration ist nur für eine Probenzusammensetzung gültig- Für robuste Kalibration viele Proben nötig- Nur organischen Proben messbar

2.2. Aufbau eines Nahinfrarotspektrometers

Generell besteht ein Spektrometer immer aus folgenden Bauteilen [11]:

- Lichtquelle (im NIR-Bereich meist Wolfram-Lampen)
 - Erzeugen einer kontinuierlichen elektromagnetischen Strahlung
- Monochromator
 - Zerlegung des polychromatischen Lichtstrahls in definierte Wellenlängenbereiche
- Detektor
 - Umwandlung der monochromatischen Strahlung in elektrische Energie

Es gibt verschiedene Messtechniken, die zu unterschiedlichen Spektrometer-Typen führen. Am häufigsten wird das Prinzip der Fourier-Transformation (FT) verwendet [3]. Hierzu gehören zwei Untergruppen. Das Michelson-Interferometer und das Polarisationsinterferometer, deren Messprinzipien im folgenden Kapitel genauer erläutert werden.

Die Monochromatortechnik, im Speziellen der AOTF (acousto-optic tunable filter) und der Diodenarray verwendet keine bewegliche Teile, was zu hohen Messraten führt. In dieser Arbeit auf diese Technik jedoch nicht weiter eingegangen. Weiterführende Informationen dazu finden sich hier: [3].

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Der Unterschied von FT-Spektrometern zu dispersiven Geräten zeigt sich darin, dass bei FT-Spektrometern alle Frequenzen des NIR-Bereichs zusammen auf die Probe aufgestrahlt werden und im Detektor erfasst werden. Dadurch entsteht eine Zeitersparnis gegenüber den dispersiven Geräten, da hier jede Wellenlänge einzeln eingestrahlt und detektiert werden muss.

2.3. Michelson-Interferometer

Der Verlauf der Strahlen vom Laser zum Detektor lässt sich anhand von Abb. 2.4 erklären. Der Laserstrahl wird beim Auftreffen auf den halbdurchlässigen Spiegel in zwei identische Wellen geteilt und nun in zwei verschiedene Richtungen gelenkt. Die erste Welle trifft auf den festen Spiegel und wird wieder reflektiert. Die zweite Welle trifft auf einen beweglichen Spiegel und wird auch wieder reflektiert. Beide treffen nun wieder auf den halbdurchlässigen Spiegel und werden von dort aus zum Detektor geleitet. Ist nun der Abstand der beiden Spiegel zum halbdurchlässigen Spiegel gleich groß, verstärken sich die beiden Strahlen wieder.

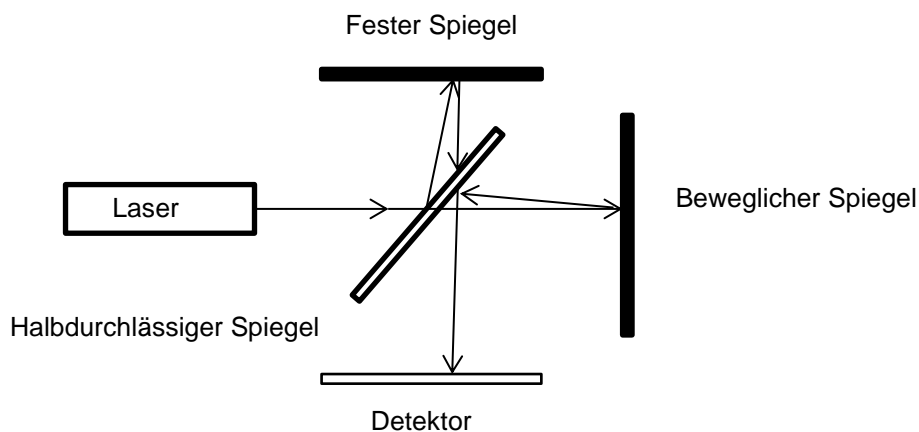


Abb. 2.4: Aufbau eines Michelson-Interferometers; modifiziert nach [3]; erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

Werden die im ersten Schritt erzeugten Teilstrahlen nun über verschiedenlange Wege (beweglicher Spiegel wird verstellt) geleitet, ergibt sich eine Phasendifferenz zwischen den beiden Strahlen. Die Überlagerung solcher Wellen bezeichnet man als Interferenz. Zwei Wellen, die die gleiche Wellenlänge, Amplitude und

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Schwingungsrichtung besitzen löschen sich dann aus, wenn die Weglängendifferenz eine halbe Wellenlänge ($\lambda/2$) oder ein ganzzahliges Vielfaches davon beträgt.

Wird nun eine Probe in den Strahlengang eingeführt und der bewegliche Spiegel mit einer festgelegten Geschwindigkeit bewegt, damit die verschiedenen Wellenlängen erzeugt werden können, kann aus dem Interferogramm durch Fourier-Transformation ein NIR-Spektrum der Substanz erzeugt werden.

2.4. Polarisationsinterferometer

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete NIRFlex N500 der Büchi Labortechnik GmbH ist mit einem Polarisationsinterferometer anstelle eines Michelson-Interferometers ausgestattet. Hier werden anstatt von Spiegeln bewegliche, anisotrope TeO_2 -Kristalle verwendet. Wenn das Licht auf den Kristall trifft, wird dieses wie bei dem Spiegel aufgespalten. Diese Strahlen sind senkrecht zu einander polarisiert.

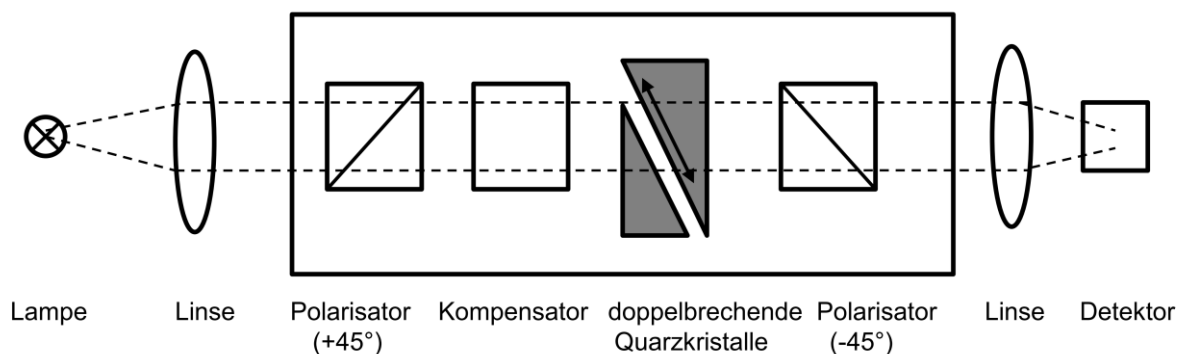


Abb. 2.5: Aufbau des verwendeten Polarisationsinterferometers, welches im Büchi NIRFlexN500 verbaut ist; modifiziert nach [12]; erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

Das im Polarisator unter 45° polarisierte Licht tritt in den Kristall ein und wird in zwei Teilstrahlen gespalten. Diese Teilstrahlen durchqueren den Kristall mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Durch die parallele Verschiebung der TeO_2 -Kristalle ändert sich die Wegstrecke der Strahlen. So kann die Phasenverschiebung systematisch variiert werden. Bei monochromatischem Licht lässt sich, nachdem es den zweiten Polarisator passiert hat, eine sinusförmige Variation der Strahlungsintensität beobachten. Wie beim Michelson-Interferometer wird auch bei dem Polarisationsinterferometer ein Spektrum durch Fourier-Transformation und Differenz zur Hintergrundmessung erhalten [13].

2.5. Detektor

Das NIR-Signal wird von der Probe, die dieses Signal je nach Messmethode entweder absorbiert und reflektiert oder transmittiert zum Detektor geleitet. Es gibt verschiedene Detektortypen. Häufig werden InGaAs-Detektoren verwendet. Sie besitzen eine schnelle Ansprechrate, was bei den schnell scannenden FT-NIR-Spektrometern von Vorteil ist [3].

3. Orthogonale Verfahren

Da die Nahinfrarotspektroskopie keine absolute Bestimmungsmethode darstellt, sind orthogonale Verfahren nötig, um die für die Kalibrierung nötigen Gehaltswerte der einzelnen Proben zu ermitteln. Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren werden nachfolgend kurz beschrieben.

3.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenchromatographie, bei der das Elutionsmittel (mobile Phase) mit hohem Druck durch eine mit der stationären Phase dicht gepackten Edelstahlsäule gepresst wird [7].

Für die HPLC stehen mehrere Trennverfahren zu Verfügung, die in Abhängigkeit von der zu analysierenden Probe eingesetzt werden. Dabei werden vor allem die Prinzipien der Adsorption, der Massenverteilung, des Ionenaustausches, des Molekülgrößenausschlusses aber auch stereoselektive Wechselwirkungen zur Trennung von Substanzgemischen angewendet [14].

Eine HPLC-Anlage besteht aus folgenden Bauelementen:

- Vorratsgefäß für Elutionsmittel
- Pumpensystem
- Probeneinlass (Autosampler)
- Säule zur Chromatographie (gegebenenfalls thermostatisiert)
- Detektor
- Datenerfassungssystem

Ablauf der HPLC-Trennung:

Die mobile Phase wird aus einem oder mehreren Vorratsbehältnissen gefördert. Sie wird von *der Pumpe* (pulsationsfrei) mit einer vorgegebenen Durchflussrate an *dem Probeneinlass* vorbei durch *die Säule* zu *dem Detektor* gepresst und von einer Auswertesoftware zur Interpretation durch den Analytiker aufbereitet [14]. Die zur Herstellung der mobilen Phase verwendeten Flüssigkeiten müssen von besonderer (HPLC-) Qualität sein und dürfen bei dem verwendeten *Detektor* keine Störsignale verursachen [7].

Die Füllung der Trennsäule, die stationäre Phase, wird in Abhängigkeit von der durchzuführenden Trennung ausgewählt. Je nach verwendetem Trennverfahren stehen verschiedene Substanzen zu Verfügung. Die häufigste Anwendung findet die so genannte Umkehrphasenchromatographie (reversed phase = RP), bei der mit *Alkyldimethylchlorsilanen* modifiziertes Siliciumdioxid als weitgehend unpolare stationäre Phase und Eluenten wie z.B. Acetonitril und Methanol als relativ polare mobile Phase eingesetzt werden [14]. Eine Trennung der Analyten wird bei der RP-HPLC über eine Verteilung zwischen der mobilen und der stationären Phase erreicht.

Bei der Verwendung der Säulen zur Chromatographie ist darauf zu achten, dass die Angaben z.B. bezüglich zulässigem pH-Wert der mobilen Phase und Druckbereich eingehalten werden, ansonsten ist die Funktionsfähigkeit der Säule nicht gewährleistet [14].

Auch die Wahl eines geeigneten Detektors hängt von der zu analysierenden Probe ab. Da sehr viele Substanzen über einen Chromophor verfügen, wird am häufigsten der UV-VIS-Detektor eingesetzt. Dieser kann die Absorption bei einer vorgegebenen Wellenlänge messen. Der Dioden Array Detektor (DAD) ist ein weiterentwickelter UV/VIS-Detektor. Anstatt einer einzigen Wellenlänge wird hier ein bestimmter Wellenlängenbereich auf die Probe eingestrahlt und die Absorption aller in dem Bereich befindlichen Wellenlängen wird gemessen. Solch ein Detektor wird häufig in der Methodenentwicklung verwendet. Aber auch Fluoreszenz-, Brechzahl-, und Leitfähigkeitsdetektoren werden häufig eingesetzt, immer vorausgesetzt, dass die Substanzen damit detektiert werden können [7].

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Die in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Methoden sind dem Europäischen Arzneibuch 6.0 [15] entnommen und leicht abgeändert worden. Verwendet wurden neben den Grundlagen der Technik in Kapitel 2.2.29 auch die Grundlagen der Chromatographischen Trennmethoden in 2.2.46. Weitergehende Literatur findet sich z.B. hier: [16–18].

3.2. Potentiometrische Titration

Die potentiometrische Titration wird in dieser Arbeit als orthogonale Methode in Kapitel 9 verwendet. Mit diesem analytischen Verfahren ist eine direkte Bestimmung des verwendeten Wirkstoffs neben den vorliegenden Hilfsstoffen möglich. Anders als bei der HPLC muss hier keine Abtrennung der ungelösten Partikel erfolgen, denn eine Titration mit potentiometrischer Endpunktanzeige ist auch in trüber Lösung möglich [7].

In der vorliegenden Arbeit wird der folgende apparative Aufbau für eine Säure-Base-Titration verwendet.

Aus folgenden Bauteilen besteht der verwendete Titrino 702 SM der Firma Metrohm:

- Rührvorrichtung
- Bürette
- Glaselektrode als Einstabmesskette
- Vorratsgefäß
- Spannungsmesser

Vor der Durchführung einer Titration zur Gehaltsbestimmung müssen einige Voraussetzungen überprüft werden [19]:

- Stöchiometrie der Reaktion muss bekannt sein
- Quantitative Umsetzung des Analyten mit der Maßlösung mit schneller Gleichgewichtseinstellung
- Keine weiteren Reaktionen
- Der Endpunkt muss eindeutig indiziert werden können

In dem in Kapitel 9 vorliegenden Versuchsaufbau wird nach Überprüfung der oben genannten Bedingungen zur Endpunktsbestimmung der Titration eine Glaselektrode als Einstabmesskette verwendet. Hier sind Bezugselektrode und Glaselektrode in einer Messkette zusammengefasst. Dies führt meist zu einer besseren Handhabung

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

[7]. Das Messprinzip der potentiometrischen Indikation beruht auf der stromlosen Messung der auftretenden Spannung. Während der Titration kommt es durch die Veränderung der Zusammensetzung der titrierten Lösung zu Potentialdifferenzen an den Grenzflächen der Glasmenbran [7]. Diese Potentialdifferenzen folgen der Nernst-Gleichung [7].

Der Endpunkt einer potentiometrischen Titrationskurve liegt in dem Wendepunkt [19]. Der verwendete Titrino 702 SM, zeigt wie viele andere Titrierautomaten auch direkt das verbrauchte Volumen an den Wendepunkten an, sodass eine Auswertung von Hand entfällt. Weiterführende Literatur zum Thema potentiometrische Titration findet sich in [7], [20], [21], [18].

4. Multivariate Datenanalyse

Die Spektren der IR-Spektroskopie können in der Regel direkt ausgewertet werden. Im Gegensatz dazu funktioniert dies bei der NIR-Spektroskopie nur bedingt [8]. Müssen zur Auswertung mathematische und statistische Verfahren herangezogen werden, wird dies als Chemometrik oder Chemometrie [22] bezeichnet. Durch die Weiterentwicklung der Vernetzung von instrumenteller Analytik und Computertechnik haben sich auf dem Gebiet der NIR-Spektroskopie verschiedene Methoden zur mathematischen Auswertung etabliert. Dabei werden die Spektren so verändert, dass sich die Bereiche mit für die Auswertung relevanten Informationen leichter von den irrelevanten, dem sogenannten Rauschen, unterscheiden lassen.

In diesem Abschnitt werden zunächst die in dieser Arbeit verwendeten Datenvorbehandlungsmethoden vorgestellt. Anschließend beschäftigt sich dieses Kapitel mit den genutzten Auswertungstechniken. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf multivariaten Verfahren, die es ermöglichen das gesamte Spektrum gleichzeitig in die Berechnung miteinzubeziehen.

4.1. Datenvorbehandlung

Verglichen mit MIR-Spektren, ist der Informationsgehalt eines NIR-Rohspektrums (s. Abb. 4.1, links) recht gering. Daher muss vor der eigentlichen Auswertung eine geeignete Datenvorbehandlungsmethode durchgeführt werden, die an die

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Problemstellung angepasst ist. Hierbei muss abgeschätzt und ausprobiert werden, welchen Einfluss physikalische Faktoren, wie Kristallstruktur, Korngrößenverteilung und die Oberfläche der vermessenen Proben auf das Spektrum haben [23]. Meist kommt es hier zu Lichtstreuungseffekten, die wiederum die Reproduzierbarkeit negativ beeinflussen [15,16]. Es ist auch nicht jede Methode gleich gut für jede Problemstellung geeignet. Häufig kommt es vor, dass erst eine gezielte Kombination mehrerer mathematischer Prozesse zu dem gewünschten Erfolg führt [24].

Nachfolgend sind die Methoden erläutert, die in der vorliegenden Arbeit zur Datenvorbehandlung von Nahinfrarotspektren genutzt wurden.

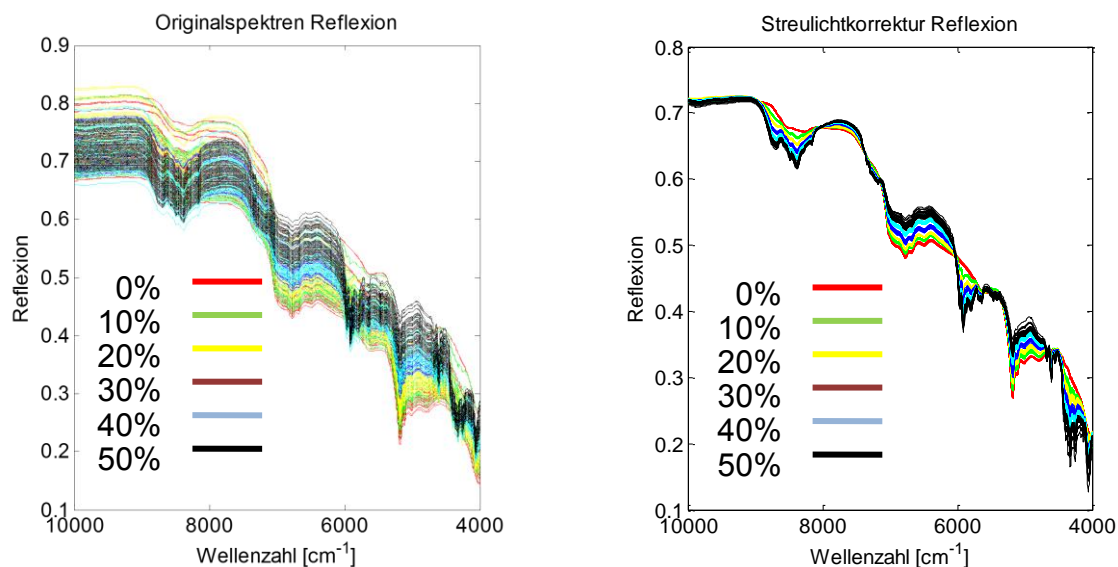


Abb. 4.1: Vergleichende Darstellung von Tablettspektren verschiedener Zusammensetzung. Links sind die Originalspektren abgebildet, rechts dieselben Spektren nach einer Streulichtkorrektur als Datenvorbehandlung. So können die Unterschiede der verschiedenen Spektren visualisiert werden.

4.1.1. Normierung

Mithilfe der Normierung von Spektren lassen sich multiplikative Effekte entfernen. Die Originalform des Spektrums bleibt aber erhalten. So werden zwei Spektren, bei denen die Banden das gleiche Verhältnis zueinander haben, aber für jedes Spektrum unterschiedliche maximale Intensitäten vorliegen, durch die Normierung identisch [24]. Sie lässt sich auch auf einen ausgewählten Teilbereich des Spektrums anwenden, um z.B. bestimmte Wellenlängenbereiche mit zu großen Messfehlern auszuschließen. Eine Normierung kann auf verschiedene Arten erfolgen [24]. Meist wird auf den Gesamtmittelwert eines Spektrums (a_k^{norm}) normiert (Gl. 4.1).

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

$$a_k^{norm} = \frac{a_k}{\frac{1}{M} \sum_{k=1}^M a_k} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

a_k : Spektrenwert (Absorption bei Wellenlänge k)

M : Anzahl der Datenpunkte des Spektrums

4.1.2. Ableitung

Eine Ableitung stellt die beste Methode dar, Basislinieneffekte aus Spektren zu entfernen. Überlappende Banden oder auch Schultern können durch die Ableitung hervorgehoben werden und sind dadurch deutlicher erkennbar [24]. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Anzahl Datenpunkte für die numerische Ableitung nicht zu groß gewählt wird. Ansonsten geht wichtige spektrale Information verloren. Auch wenn das Spektrum durch die Ableitung seine ursprüngliche Form verliert, ist diese Methode wegen ihrer Leistungsfähigkeit und Einfachheit eine weit verbreitete Methode zur Datenvorbehandlung. Leider kann dadurch allerdings auch die Interpretation im Verlauf der Hauptkomponentenanalyse (PCA) und „Partial-Least-Squares“-Regression (PLS) erschwert werden [24]. In dieser Arbeit wird die von Savitzky und Golay [25] entwickelte Ableitung zur Datenvorbehandlung verwendet. Bei der Ableitung über einen Polynomfit oder auch Savitzky-Golay-Ableitung wird das gemessene Spektrum lokal mit einem Polynom angenähert [24]. Über Gl. 4.2 lässt sich ein Spektrum mit einem Polynom n -ten Grades beschreiben, welches sich ableiten lässt. Über k die Anzahl der Datenpunkte lässt sich festlegen, wie groß der angenäherte Spektrenausschnitt sein soll. Da die Ableitung Punktweise erfolgt, muss für eine vollständige Ableitung nach Savitzky und Golay jeder Punkt eines Spektrums einzeln abgeleitet werden.

$$\text{Gemessenes Spektrum: } a = \alpha + \beta x + \gamma x^2 + \delta x^3 + \dots + \varepsilon x^n \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Folglich ergibt sich für die erste und zweite Ableitung folgendes:

$$1. \text{ Ableitung: } a' = 0 + \beta + 2\gamma x + 3\delta x^2 + \dots + n\varepsilon x^{n-1} \quad (\text{Gl. 4.3})$$

$$2. \text{ Ableitung: } a'' = 0 + 0 + 2\gamma + 6\delta x + \dots + (n-1)n\varepsilon x^{n-2} \quad (\text{Gl. 4.4})$$

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Die erste Ableitung, wie Gl. 4.3 zeigt, hat also eine Entfernung der konstanten Basislinie α zur Folge. Führt man dagegen die zweite Ableitung (siehe Gl. 4.4) aus, werden hingegen lineare Effekte βx eliminiert.

Für die Spektroskopie bietet die Savitzky-Golay-Ableitung eine vorteilhafte Kombination aus vorangehender Glättung und anschließender Ableitung mit variabler Fensterbreite und Glättungsfaktoren und ist der einfachen „Punkt für Punkt-Ableitung“ meist überlegen. Die über die Ableitung nach Savitzky und Golay erzeugten Spektren sind robuster gegenüber vorhandenem Rauschen [24]. Weiterhin gehen durch die vorangehende Glättung mit abschließender Ableitung weniger spektrale Information verloren.

Vorrangig werden, abhängig von der Höhe der Ableitungen, bis zu 25 Stützpunkte und Polynome höherer Ordnung verwendet [24]. In dieser Arbeit wurde durchgängig mit einem Polynom 3. Ordnung und 15 Stützpunkten gearbeitet.

4.1.3. Korrektur von Streueffekten

Die in dieser Arbeit vermessen Proben wurden vor allem in diffuser Reflexion vermessen. Diese Spektren zeigen häufig Unterschiede, die durch die inhomogene Verteilung der Streuzentren entstehen [24]. Da die Streuung nicht nur abhängig von der Wellenlänge, sondern auch von der Teilchengröße ist, verändert sich die Streuung über das gesamte Spektrum [24].

4.1.3.1. MSC

Die MSC (Multiplicative Scatter Correction) stellt eine viel genutzte Methode dar, um Streulichte effekte aus den Spektren zu entfernen. Dabei werden die Spektren mit Hilfe eines idealen Spektrums korrigiert. Weil ein Idealspektrum aber nie zu messen sein wird, und die Berechnungen daher auf der Basis des Mittelwertspektrums vollzogen werden, muss bei der Veränderung des Datensatzes bedacht werden, dass auch die MSC – Berechnung wiederholt werden muss. So kann die mittlere Streuung und Basislinie in die Korrektur integriert werden. Hierzu werden die einzelnen Spektren (x_i) nach folgendem Ansatz über lineare Regression an das Mittelwertspektrum \bar{x} angenähert [26]:

$$x_i = a_i + b_i \bar{x} + e_i \quad (\text{Gl. 4.5})$$

In dieser Formel werden über a_i und b_i jeweils Streuung und Basislinienfehler dargestellt, die für jedes Spektrum i bestimmt werden müssen. In e_i findet sich hingegen die in den meisten Fällen gesuchte interessante chemische Information. So kann dann die MSC-Korrektur über Gl. 4.6 ermittelt werden:

$$x_{i, MSC} = (x_i - \mathbf{1}a_i) / b_i; \quad i = 1 \dots n \quad (\text{Gl. 4.6})$$

Die $\mathbf{1}$ in Gl. 4.6 bezeichnet dabei einen Spaltenvektor, der vollständig aus Einsen besteht.

4.1.3.2 Standardisierung von Spektren (SNV)

Eine Standardisierung (SNV) der Spektren zeigt ein ähnliches Endergebnis wie die Korrektur durch die in 4.1.3.1 beschriebene MSC. Die SNV wird nach der in Gl. 4.7 beschriebenen Formel berechnet [24]:

$$\text{für } j=1 \dots p \quad \bar{x}_i = \frac{1}{p} \sum_{j=1}^p x_{i,j}; \quad \sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (x_{i,j} - \bar{x}_i)^2}{p-1}}; \quad x_{i,j, SNV} = \frac{x_{i,j} - \bar{x}_i}{\sigma_i} \quad (\text{Gl. 4.7})$$

Bei \bar{x} handelt es sich um den Mittelwert über alle Absorptionen bei den zur Berechnung verwendeten Wellenlängen. Weiterhin erfolgt eine Division mit der Standardabweichung σ_i [24].

Hier wird im Unterschied zur MSC jedes Spektrum für sich korrigiert und kein „Ideales Spektrum“ benötigt.

4.2. Hauptkomponentenanalyse

In der multivariaten Statistik wird die Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis = PCA), auch Singulärwertzerlegung (engl. Singular value decomposition = SVD) bzw. Faktorenanalyse genannt, genutzt um Datensätze in ihrer Dimension so zu reduzieren, dass diese durch wenige Variablen beschrieben werden können [24]. In der Nahinfrarotspektroskopie, wie in der Schwingungsspektroskopie allgemein, sind die Variablen m einer Datenmatrix oft stark miteinander korreliert. Daher ist es möglich, die Anzahl der ursprünglichen Variablen auf die sogenannten latenten Variablen (untereinander nicht korrelierte

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Variablen) zu reduzieren. Mathematisch werden diese neuen Variablen aus den unterschiedlich gewichteten Originalvariablen zusammengesetzt. Dies geschieht unter Erhaltung der ursprünglichen Information [24], [22], [27], sofern keine Dimensionsreduktion vorgenommen wird.

Mathematisch besteht die Matrix \mathbf{X} aus n Objekten (Zeilen) und m Variablen (Spalten). Dabei wird \mathbf{X} zentriert, indem der Spaltenmittelwert von den Werten der Variablen abgezogen wird.

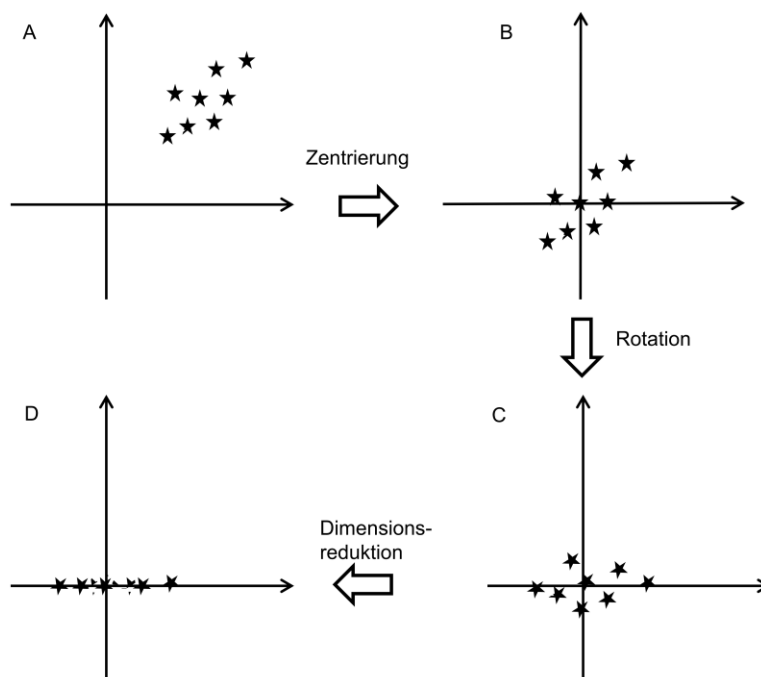


Abb. 4.2: Bildhafte Darstellung der Hauptkomponentenanalyse. Von **A** nach **B** werden die Daten zentriert. In **C** wird das neue Koordinatensystem so ausgerichtet, dass sich die erste Hauptachse (PC1) in Richtung der maximalen Varianz erstrecken, senkrecht dazu verläuft die zweite Hauptkomponente. Findet nun eine Dimensionsreduktion **D** statt, geht die Varianz in der 2. Dimension verloren. Modifiziert nach [28], erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

Für das Auffinden der Hauptkomponente wird folgendermaßen vorgegangen, eine graphische Darstellung erfolgt in Abb. 4.2: Zuerst wird diejenige Achse gesucht, durch die die größtmögliche Varianz in der Datenmatrix erfasst wird und diese als erste Hauptkomponente (PC1) festgelegt. Wenn zuvor eine Zentrierung durchgeführt wurde, stellt der Mittelpunkt aller Daten nun den neuen Koordinatenursprung dar. Für jede weitere Hauptkomponente besteht die Anforderung, dass sie durch den neuen Koordinatenursprung gelegt wird und orthogonal zur vorangehenden Komponente ausgerichtet ist. Für alle folgenden Komponenten gilt die Regel, dass diejenige Achse mit der die meiste Varianz beschrieben werden kann als nachfolgende Hauptkomponente ausgewählt wird. Um eine Dimensionsreduktion zu erreichen,

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

muss zuerst festgelegt werden, wie viele Dimensionen notwendig sind, um hochdimensionale Daten zu beschreiben. Als Reduktionskriterium wird die Varianz der ersten Hauptkomponenten zur Gesamtvarianz ins Verhältnis gesetzt. Meist wird dann auf diejenige Anzahl Hauptkomponenten reduziert, die mindestens 95% der Gesamtvarianz abbilden [29]. Für graphische Darstellungen ist es dabei von Vorteil, wenn zwei bis drei Hauptkomponenten dazu ausreichen.

Bei der Durchführung der Hauptkomponentenanalyse auf der Basis von spektroskopischen Daten wird die Singulärwertzerlegung (SVD) genutzt, um die unten gezeigte Matrixfaktorisierung zu berechnen. Dazu ist die Lösung eines Eigenwertproblems nötig [30].

Die zentrierte Matrix **X** wird in die Diagonalmatrix **S** und die orthonormalen Matrizen **U** und **V** zerlegt.

$$\mathbf{X} = \mathbf{U} * \mathbf{S} * \mathbf{V}^T \quad (\text{Gl. 4.8})$$

Die entstandenen Spalten in **V**, die auch „Loadings“ genannt werden, sind identisch mit den Eigenvektoren der Varianz-Kovarianz-Matrix Σ von **X**. Die Matrix **S**, die in ihrer Eigenschaft als Diagonalmatrix nur von 0 verschiedene Werte auf der Diagonale zeigt, stellt die Singulärwerte dar. Diese erhält man aus der Quadratwurzel der Eigenwerte Λ der Varianz-Kovarianz-Matrix, die in Gl. 4.9 dargestellt wird. Die Eigenwerte sind größensortiert in der Matrix **S** gelistet. Dabei steht die Größe von $S_{i,i}$ im Zusammenhang mit der erklärten Varianz der jeweiligen Hauptkomponente.

$$\mathbf{X}^T * \mathbf{X} = \mathbf{V} * \mathbf{S}^2 * \mathbf{V}^T = \mathbf{V} * \Lambda * \mathbf{V}^T \quad (\text{Gl. 4.9})$$

Die beiden Matrizen **U** und **V** sind orthonormal. Das bedeutet mathematisch:

$$\mathbf{I}_n = \mathbf{U}^T * \mathbf{U} \text{ und } \mathbf{I}_m = \mathbf{V}^T * \mathbf{V} \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Bei \mathbf{I}_n und \mathbf{I}_m handelt es sich um Einheitsmatrizen, die aus den Dimensionen $n \times n$ und $m \times m$ erzeugt wurden. Das neue Koordinatensystem wird durch die Eigenvektoren, die Spalten von **V**, der sogenannten Loadingsmatrix, dargestellt.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Multipliziert man nun die Matrix \mathbf{X} mit \mathbf{V} , ergibt sich die Hauptkomponentenmatrix auch „Scoresmatrix“ \mathbf{T} :

$$\mathbf{T} = \mathbf{X} * \mathbf{V} = \mathbf{U} * \mathbf{S} * \mathbf{V}^T * \mathbf{V} = \mathbf{U} * \mathbf{S} \quad (\text{Gl. 4.11})$$

Diese Werte beschreiben die Koordinatenwerte im rotierten Koordinatensystem. In der Matrix \mathbf{T} ist die gesamte Varianz, die sich aus der Summe der Eigenwerte ergibt, enthalten. Dabei sind die Spalten entsprechend den Hauptkomponenten sortiert. Die erste Spalte in \mathbf{T} erklärt daher den größten Varianzanteil. Daher können über die Anzahl der Hauptkomponenten Spalten mit geringerem Informationsgehalt oder gar Rauschen entfernt werden. Weiterführende Literatur findet sich in [27], [3], [31].

4.3. Multivariate Regression

Bei der Qualitätskontrolle von Produkten in der pharmazeutischen Industrie werden immer öfter spektroskopische Methoden, wie die NIRS genutzt. Hier muss aus dem erzeugten Spektrum beispielsweise der Wirkstoffgehalt einer Tablette ermittelt werden. Zu diesem Zweck dient die multivariate Regression.

Über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion wird ein Zusammenhang zwischen den Spektren und der Zielgröße ermittelt. Hierbei hat sich vor allem die „Partial Least Squares Regression“ (PLS-Regression) bewährt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird [24].

Die PLS wurde 1960 von dem Schweden Herman Wold entwickelt [32]. Das Ziel ist hierbei die Auswertung von korrelierten Daten. Die erste Anwendung der PLS auf chemische Daten wurde von Gerlach, Kowalski und Wold veröffentlicht [33]. Die PLS-Regression zeigt dabei einen hohen Verwandtschaftsgrad zur PCA (siehe 4.2). Allerdings wird bei der PLS ein Zusammenhang von X-Daten (Spektren) zu Y-Daten (Wirkstoffgehalt) hergestellt, was den grundlegenden Unterschied zur PCA ausbildet. In Abbildung 4.3 ist der mathematische Zusammenhang der Matrizen \mathbf{X} und \mathbf{Y} dargestellt. Es werden also jeweils die Hauptkomponenten getrennt voneinander berechnet und dann ein Regressionsmodell ($\mathbf{U}=\hat{\mathbf{B}}\mathbf{T}$) zwischen den Scores der

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Hauptkomponenten erstellt. $\hat{\mathbf{B}}$ stellt eine Diagonalmatrix dar, die die Regressionskoeffizienten $\hat{\beta}_j$ enthält.

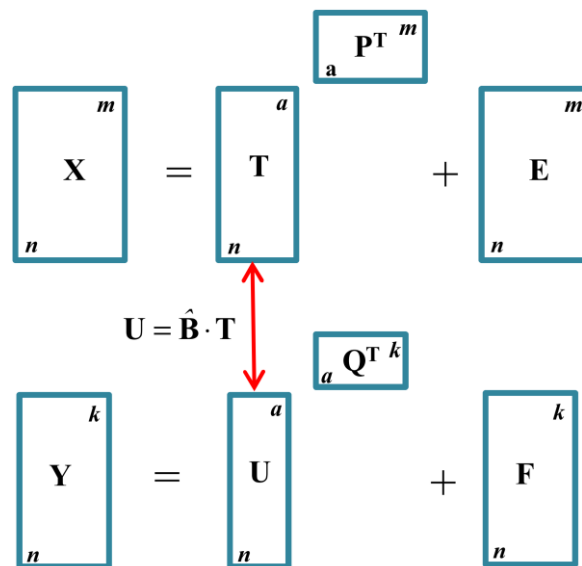


Abb. 4.3: Veranschaulichung des Zusammenhangs der PLS-Matrizen [28]: Matrix \mathbf{X} wird in die „Score“-Matrix \mathbf{T} , die „Loadings“-Matrix \mathbf{P}^T und einer Fehlermatrix \mathbf{E} zerlegt. Die Y-„Scores“ (\mathbf{U}) und Y-„Loadings“ (\mathbf{Q}^T) bilden mit dem Fehlerterm \mathbf{F} zusammen die Matrix \mathbf{Y} . Maximale Korrelation von \mathbf{U} und \mathbf{T} ist das Ziel der Berechnung, erstellt mit Microsoft™ PowerPoint®.

Die verwendete Anzahl der Hauptkomponenten a bei der Durchführung der PLS-Berechnung wird bestimmt, indem eine Kreuzvalidierung (siehe 4.5) durchgeführt wird. Das Modell, aus dem der niedrigste PRESS (siehe G. 4.18) resultiert, sollte verwendet werden. Zur Berechnung von \mathbf{T} , \mathbf{P} , \mathbf{U} und \mathbf{Q} wird häufig der NIPALS-Algorithmus verwendet, der von Wold 1975 publiziert wurde [34]. Um \mathbf{T} und \mathbf{U} berechnen zu können, wird über gewichtete „Loadings“ (\mathbf{W} und \mathbf{C}) die Korrelation zwischen den \mathbf{X} - und \mathbf{Y} -Daten erstellt [24]. Der folgende Algorithmus bestimmt a PLS2-Komponenten. Bei PLS2 besteht \mathbf{Y} aus mehreren Spalten, bei PLS1 nur aus einer Spalte. a bildet den Rang der Score-Matrix \mathbf{T} ab. Bei PLS1 startet man mit dem ersten y -Vektor. Bei PLS2 stellt \mathbf{u}_a den y -Vektor mit der größten euklidischen Norm dar ($\max(\|\mathbf{Y}_i\|)$) [24].

Die Initialisierung des Algorithmus erfolgt über:

$$a=1$$

$\mathbf{X}_a = \mathbf{X}$ (spaltenzentriert, d.h. über jede Spalte wird ein Mittelwert berechnet, der von jedem Wert der Spalte subtrahiert wird.)

$\mathbf{Y}_a = \mathbf{Y}$ (spaltenzentriert)

$$\mathbf{u}_a = \max(\|\mathbf{Y}_i\|)$$

NIPALS-Algorithmus zur Berechnung der PLS2-Komponenten nach [24] :

Start: $\mathbf{w}_a = \frac{\mathbf{X}_a^T \cdot \mathbf{u}_a}{\mathbf{u}_a^T \cdot \mathbf{u}_a}$	Gewichtete \mathbf{X}_a –Loadings bestimmen
$\mathbf{w}_a = \frac{\mathbf{w}_a}{ \mathbf{w}_a }$	\mathbf{w}_a auf Länge 1 skalieren
$\mathbf{t}_a = \mathbf{X}_a \cdot \mathbf{w}_a$	\mathbf{X}_a Scores berechnen (a-te Spalte von \mathbf{T}_a)
$\mathbf{c}_a = \frac{\mathbf{Y}_a^T \cdot \mathbf{t}_a}{\mathbf{t}_a^T \cdot \mathbf{t}_a}$	Gewichtete \mathbf{Y}_a -Loadings bestimmen (a-te Spalte von \mathbf{C}_a)
$\mathbf{c}_a = \frac{\mathbf{c}_a}{ \mathbf{c}_a }$	\mathbf{c}_a auf Länge 1 skalieren
$\mathbf{u}_a = \mathbf{Y}_a^T \cdot \mathbf{c}_a \cdot (\mathbf{c}_a^T \cdot \mathbf{c}_a)$	\mathbf{Y}_a –Scores berechnen (Bei Konvergenz* weiter, ansonsten nochmals bei Start beginnen)
$\mathbf{p}_a = \mathbf{X}_a^T \cdot \mathbf{t}_a \cdot (\mathbf{t}_a^T \cdot \mathbf{t}_a)$	\mathbf{X}_a –Loadings berechnen (a-te Spalte von \mathbf{P}_a)
$\mathbf{q}_a = \mathbf{Y}_a^T \cdot \mathbf{u}_a \cdot (\mathbf{u}_a^T \cdot \mathbf{u}_a)$	\mathbf{Y}_a –Loadings berechnen (a-te Spalte von \mathbf{Q}_a)
$\hat{\beta}_a = \frac{\mathbf{u}_a^T \cdot \mathbf{t}_a}{\mathbf{t}_a^T \cdot \mathbf{t}_a}$	Regression von \mathbf{u}_a auf \mathbf{t}_a
$\mathbf{E}_a = \mathbf{X}_a - \mathbf{t}_a \cdot \mathbf{p}_a^T$ $\mathbf{F}_a = \mathbf{Y}_a - \hat{\beta}_a \cdot \mathbf{t}_a \cdot \mathbf{c}_a^T$	Fehlermatrizen berechnen
$\mathbf{X}_{a+1} = \mathbf{E}_a$ $\mathbf{Y}_{a+1} = \mathbf{F}_a$	Darstellung der Restvarianzen
Weitere PLS-Komponenten können von oben mit $a=a+1$ berechnet werden	

* Konvergenz: Wenn die Norm von $\Delta ||\mathbf{t}_a||$ kleiner als ein vorgegebener Schwellenwert (hier 10^{-10}) ist, liegt Konvergenz vor. $\Delta ||\mathbf{t}_a||$ ergibt sich aus der Differenz des Vektors \mathbf{t}_a der aktuellen und der vorangegangenen Iteration.

4.4. Lineare Diskriminanzanalyse

Die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) wurde zum ersten Mal 1936 von Fisher beschrieben [35]. Sie wird genutzt, um zu klären, ob Objekte eines Trainingsdatensatzes oder unbekannte Objekte zuverlässig einer der bestehenden Objektgruppen, sogenannten Klassen, zugeordnet werden können [22,36]. Weiterhin kann mit diesem multivariaten Verfahren festgestellt werden, ob sich Klassen signifikant voneinander unterscheiden. Eine multivariate Normalverteilung und gleiche Varianz-Kovarianz-Matrizen der Klassen stellen eine Voraussetzung dar.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Das Ziel der Diskriminanzanalyse ist eine Gruppentrennung. Mathematisch soll hierbei das Verhältnis aus Streuung zwischen den Gruppen zu der Streuung innerhalb der Gruppen maximal sein.

Die Klassifikation kann beispielsweise mit Hilfe der Mahalanobis-Distanz \mathbf{D} durchgeführt werden. Sie wird nach Gl. 4.12 definiert. Dabei stellen \mathbf{x}_1 und \mathbf{x}_2 Vektoren dar.

$$\mathbf{D}(x_1, x_2) = \sqrt{(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_2)^T \cdot \mathbf{C}^{-1} \cdot (\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_2)} \quad (\text{Gl. 4.12})$$

\mathbf{C}^{-1} stellt die Inverse der Varianz-Kovarianz-Matrix dar. Für eine spaltenzentrierte Matrix \mathbf{X} ist diese definiert als:

$$\mathbf{C} = \frac{1}{n-1} \cdot \mathbf{X}^T \cdot \mathbf{X} \quad (\text{Gl. 4.13})$$

Zunächst werden die Zentroiden der Klassen $\hat{\mu}_j$ und die Varianz-Kovarianz-Matrix $\hat{\mathbf{C}}$ auf Basis der Trainingsdaten geschätzt.

$$\hat{\mu}_j = \sum_{gi=j} \mathbf{x}_i / n_j \quad (\text{Gl. 4.14})$$

$$\hat{\mathbf{C}} = \sum_{j=1}^k \sum_{gi=j} (\mathbf{x}_i - \hat{\mu}_j) \cdot (\mathbf{x}_i - \hat{\mu}_j)^T / (m - k) \quad (\text{Gl. 4.15})$$

Mit $\sum_{gi=j}$ wird hierbei das Summieren über alle Objekte i der Klasse j bezeichnet.

Ein neues Objekt \mathbf{x}_{neu} wird nach der Klassifikation derjenigen Klasse zugeordnet, die den Maximalwert der Diskriminanzfunktion $d_j(\mathbf{x})$ (Gl. 4.16) zeigt.

$$d_j(\mathbf{x}) = -D(\mathbf{x}, \mu_j)/2 + \ln \prod_j \quad (\text{Gl. 4.16})$$

Dabei entspricht $D(\mathbf{x}, \mu_j)$ der Mahalanobis-Distanz nach Gl. 4.12. Durch das Einbinden der Bayes'sche Statistik [36,37] in das Klassifikationsmodell, lässt sich Vorwissen über Einzelwahrscheinlichkeiten (sogenanntes *a priori* Wissen) in das Modell integrieren. Im zweiten Term von $d_j(\mathbf{x})$ ist dieses Wissen über die Wahrscheinlichkeit \prod_j der Klasse j (Gl. 4.17) integriert.

$$\Pi_j = n_j/n \quad (\text{Gl. 4.17})$$

In der LDA werden immer alle Objekte einer bestimmten Klasse zugeordnet. Ausreißer können erkannt werden, indem die Distanzen der einzelnen Objekte zum Zentroid betrachtet und beurteilt werden.

4.5. Validierung

Das reine Erstellen eines Kalibriermodells ist nicht genug, im Weiteren muss ein Maß für die Qualität der Vorhersagen angegeben werden. Nur so kann gesichert werden, dass eine Analysenmethode geeignet ist neue, unbekannte Proben vorherzusagen.

Um die Güte eines erstellten Modells realistisch beurteilen zu können, muss eine Überprüfung mit Hilfe eines Testdatensatzes durchgeführt werden. Dabei ist zu beachten, dass die Ergebnisse von der Auswahl der Testdaten abhängen [22]. Es bestehen verschiedene Methoden um eine Validierung eines gebildeten Modells durchzuführen. In diesem Teil wird auf die sogenannte „externe“ Testdaten-Validierung und die „interne“ Kreuzvalidierung näher eingegangen.

Problematisch für Validierungen ist die Tatsache, dass häufig die vorhandenen Datenmengen nicht allzu groß sind. Bei der Testdaten-Validierung wird die vorhandene Datenmenge in zwei Teile geteilt. Der eine Teil, die sogenannten Trainingsdaten, sollten ca. 60-80% der Spektren enthalten. Auf dieser Daten-Basis wird ein Kalibrationsmodell erstellt. Die Qualität dieses Modells wird dann mit den nicht für die Kalibration verwendeten Testdaten (20-40% der gesamten Spektrenanzahl) überprüft [12]. Die Zuordnung der Spektren zu den einzelnen Teilmengen sollte so erfolgen, dass die Test- und Trainingsdaten unabhängig voneinander sind. Diese externe Validierung benötigt eine große Anzahl Spektren. Wenn der Datensatz allerdings sehr klein ist, hängt das Ergebnis der Validierung stark von der Zuordnung der Spektren zum Trainingsdatensatz oder zum Testdatensatz ab. Ein möglichst niedriger RMSEP ist das Ziel einer Validierung (siehe Gl. 4.19). Weiterhin ist es wichtig die Aufteilung der Daten in Test- und Trainingsdaten richtig auszuwählen, denn es dürfen nur Proben gewählt werden, die den Datenraum repräsentativ aufspannen. Zuerst wird eine PCA auf der Basis aller Daten durchgeführt. Dann entnimmt man jeder Gruppe, die auf der Basis der wichtigsten Hauptkomponenten berechnet wurde, repräsentative Vertreter und

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

sammelt diese im Trainingsdatensatz. Zu diesen Spektren ist folglich auch die zugehörige Referenzanalytik durchzuführen. Nun werden weitere Vertreter für das Testdatensatz ausgewählt. Dieses Verfahren wird in [38,39] ausführlich beschrieben. In [40] werden die Nachteile eines solchen Verfahrens beschrieben. Wenn nun die Auswahl der beiden Datensätze so erfolgt ist, dass eine zu geringe Anzahl nicht repräsentativer Spektren für die Modelbildung ausgewählt wird, ist eine schlechte Vorhersageleistung die Folge.

Um den beschriebenen Fehler zu vermeiden, wird häufig das wiederholte Stichprobenziehen angewendet. In unserem Fall werden die Stichproben ohne Zurücklegen gezogen. Dieser Fall nennt sich Kreuzvalidierung (CV) [41]. Hierbei werden die Daten nicht nur einmal in Test- und Trainingsdaten geteilt sondern mehrfach. Genau wie im oben genannten Beispiel wird ein Klassifikationsmodell mit den Trainingsdaten erstellt, welches wiederum Vorhersagen der Testdaten liefert, die mit den vorhandenen Ergebnissen verglichen werden. Diese Vorgehensweise wird mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Datensätzen mehrfach wiederholt und am Ende ein Mittelwert aus allen erzeugten Wiedererkennungsraten gebildet. Die Teilung des Datensatzes kann auf verschiedene Weisen erfolgen.

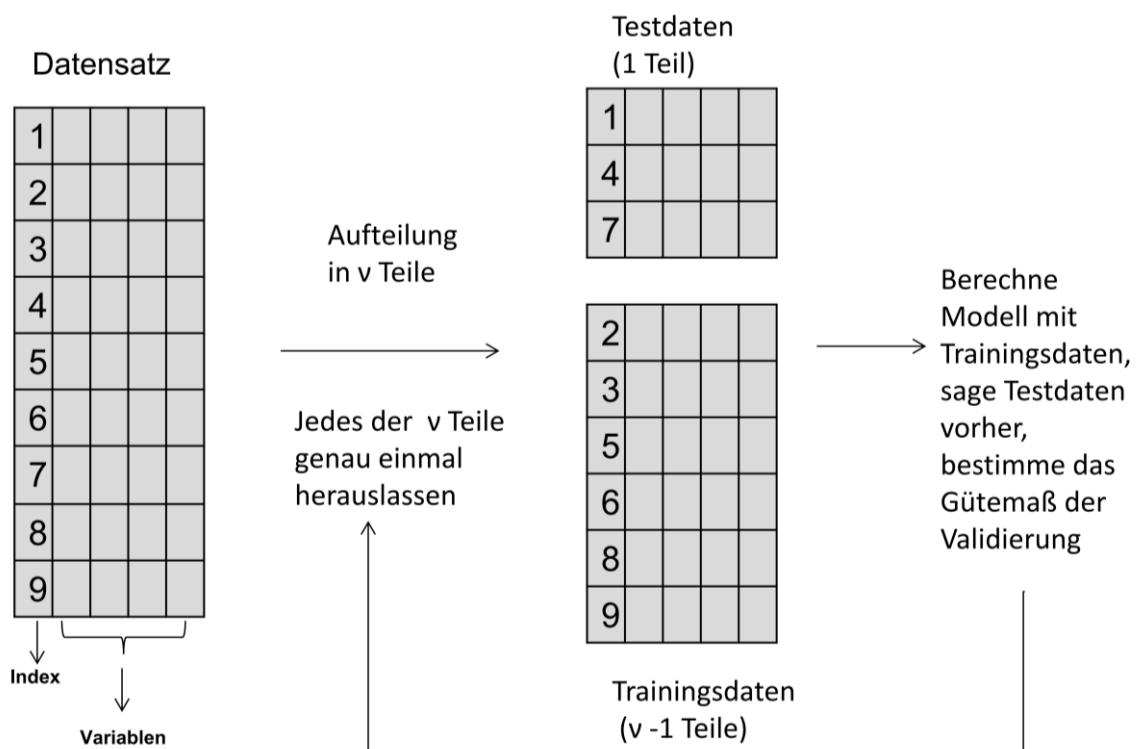


Abb. 4.4: v -fache Kreuzvalidierung mit $v=3$ nach [28]. Das Gütemaß für die Validierung ist abhängig von der Problemstellung, bei einem Klassifikationsproblem handelt es sich hierbei um die Wiedererkennungsraten. Bei einer Regression wird als Gütekriterium der RMSE berechnet. Erstellt mit MicrosoftTMPowerPoint[®].

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Zuerst erfolgt eine Beschreibung für die v -fache Kreuzvalidierung (siehe Abb. 4.4). Hierbei werden die Daten zufällig in v gleich große Gruppen aufgeteilt. Auf Basis der Trainingsdaten wird das Modell erstellt und die Testdaten vorhergesagt. Nach v Wiederholungen fungiert jeder der v Teile genau einmal als Testdatensatz.

Die „Leave-One-Out“-Kreuzvalidierung bildet einen Spezialfall der v -fachen Kreuzvalidierung. Hierbei stellt v die Anzahl der Objekte n des Datensatzes dar [42]. So kann immer exakt ein Objekt aus dem Trainingsdatensatz herausgelassen und als Testdatensatz genutzt werden. Weiterhin wird in Kapitel 8 für die Überprüfung der Ergebnisse der Linearen Diskriminanzanalyse das Schema der blockweisen Kreuzvalidierung verwendet. Hier werden mehrmals ganze Blöcke als Testdaten vorhergesagt. Dabei bildet diese Form der Validierung einen Sonderfall, bei der beispielsweise alle Messungen einer Konzentration oder alle Wiederholungsmessungen einer Probe vorhergesagt werden.

Im nachfolgenden Abschnitt werden diejenigen Werte kurz vorgestellt, die die Güte einer Validierung charakterisieren:

Durch PRESS (predictive residual sum of squares) beschreibt man die Summe der quadrierten Residuen. Dieser wird auch Fehlerquadratsumme genannt:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{-i})^2 \quad (\text{Gl. 4.18})$$

y_i : gemessener Wert

\hat{y}_{-i} : über Regressionsfunktion berechneter Wert, dabei bedeutet $-i$, dass das i -te Objekt aus dem Testdatensatz herausgenommen wurde.

Dividiert man nun die Fehlerquadratsumme durch die Probenzahl, erhält man als Quotienten die Restvarianz. Zieht man nun die Wurzel aus der Restvarianz, gelangt man zum mittleren Fehler, dem RMSEP (root mean squared error of prediction):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,Test} - \hat{y}_{i,Test})^2}{n}} = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (\text{Gl. 4.19})$$

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Durch die Berechnung des RMSECV (root mean square error of cross-validation) lässt sich die Qualität einer Kreuzvalidierung bestimmen. Hierbei liegt der Unterschied zur Berechnung des RMSEP nur im Datensatz, für den bei der Kreuzvalidierung häufig nur ein Spektrum (mit $-i$ gekennzeichnet) herausgenommen und vorhergesagt wird.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{-i})^2}{n}} \quad (\text{Gl. 4.20})$$

Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird als relative Gütekennzahl verwendet und beschreibt den Anteil der durch das Modell (in Form von \hat{y}) erklärten Varianz an der Gesamtvarianz von y . Dabei stellt \bar{y} den Mittelwert über alle y dar.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,Test} - \hat{y}_{i,Test})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Gl. 4.21})$$

4.6 MCR-ALS

Für die Zerlegung von Tabletten-Spektren in Reinstoff-Spektren (siehe Kap. 7) wird die „Multivariate Curve Resolution“ (MCR) im Zusammenhang mit einem „Alternating Least-Squares“ (ALS) Algorithmus verwendet, die folgendermaßen definiert wird:

„Es handelt sich um eine Gruppe von Techniken, die der Rückgewinnung reiner Reaktionsprofile (Spektren, pH-Profil, Zeit-Profil, Elutionsprofil,...) chemischer Bestandteile von Mischungen in chemischen Prozessen dient, von denen keine vorherige Information über die Art und die Zusammensetzung der Mischung vorhanden ist“ [43].

MCR wurde zuerst für die Prozessanalytik entwickelt, doch heutzutage hat sich das Einsatzgebiet vergrößert. Es wird nun auch für sogenannte nicht-evolutionäre Mehrkomponenten-Systeme (z.B. spektroskopische Bilder, Daten aus der Umweltüberwachung) angewendet [44,45].

Laut R. Tauler existieren zwei Bedingungen, die es ermöglichen MCR auf einem Multikomponenten-System anzuwenden.

1. Die experimentellen Daten müssen als bilineare Daten-Matrix erzeugt werden können oder es muss eine Multiset-Struktur im Datensatz vorliegen. Mit einer

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Multiset-Struktur ist gemeint, dass Vektoren in einer Matrix mehrfach in einem Datensatz vorkommen.

2. Der Datensatz muss mittels bilinearen Modells unter Verwendung einer begrenzten Anzahl Komponenten zerlegt werden können.(Abb. 4.5 u. Gl. 4.22)

Diese Datenmatrix **D** ist aus dem Reinspektren **S**, dem dazugehörigen Konzentrationsprofil **C** und einer Fehlermatrix **E** zusammengesetzt.

Das Diagramm zeigt die Gleichung $D = C S^T + E$. Die Matrix **D** ist ein breiter blauer Kasten. Die Matrix **C** ist ein schmaler blauer Kasten. Die Matrix **S^T** ist ein noch schmalerer blauer Kasten. Die Matrix **E** ist ein breiter blauer Kasten. Alle Kästen sind mit einem blauen Rahmen versehen. Die Gleichung ist mit einem blauen Gleichheitszeichen und einem blauen Pluszeichen dargestellt.

D: Datenmatrix, **C**: Konzentrationsprofil, **S^T**= Spektrenprofile, **E**: Rauschen

Abb. 4.5: Zerlegung der Datenmatrix in Basiskomponenten [43], erstellt mit Microsoft™PowerPoint®

Der verwendete MCR-ALS Algorithmus errechnet die Lösung für das MCR basierte bilineare Modell mit Hilfe von Nebenbedingungen, d.h. als sogenannte „constrained alternating Least Squares“ Algorithmus.

Eine schematische Darstellung des Ablaufs wird in Abbildung 4.6 gezeigt. Zuerst erfolgt eine Datenvorbehandlung der Originaldatenmatrix zur vorbehandelten Datenmatrix **D**. Um den Algorithmus zu starten, ist eine anfängliche Schätzung der spektralen Profile und der Konzentrationsprofile jeder Substanz nötig [46]. Dazu wird über eine Hauptkomponentenanalyse (siehe 4.2) die Anzahl der nötigen Hauptkomponenten bestimmt. Alternativ kann mittels EFA (Evolving Factor Analysis) [47] ebenfalls die Anzahl der für die Berechnung nötigen Komponenten und die lokale Ranginformation erhalten werden. Die Berechnung der initialen Konzentrationsprofile kann ohne eingesetzte Nebenbedingungen nach Gl. 4.23 und die der Spektren nach Gl. 4.24 berechnet werden.

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (\text{Gl. 4.22})$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1} \quad (\text{Gl. 4.23})$$

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D} \quad (\text{Gl. 4.24})$$

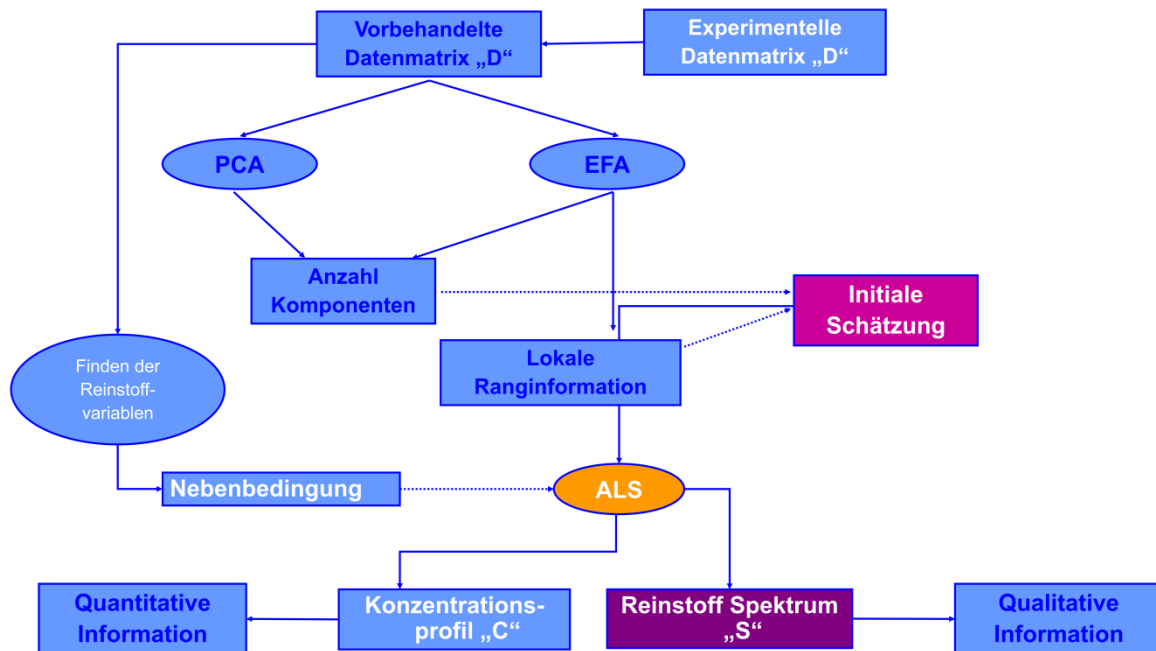


Abb. 4.6: Arbeitsablauf zur Vorhersage von Reinstoffspektren aus Mischspektren, modifiziert nach [46]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint®.

Die im ersten Schritt erhaltenen Daten dienen als eine initiale Schätzung. Im nachfolgenden Schritt wird durch die Bearbeitung mittels ALS-Algorithmus das Konzentrationsprofil und Arzneistoffspektrum vorhergesagt. Dies kann mit oder ohne gesetzte Nebenbedingungen geschehen.

Da hier auch Reinstoff- und Hilfsmittelspektren zu Verfügung stehen, werden die Hilfsmittelspektren und die Anzahl der Komponenten als Nebenbedingung für die Berechnung der Reinstoffspektren eingesetzt. Konzentrationsprofile können nicht negativ werden, daher wird diese Bedingung für alle Berechnungen hinterlegt.

Eine ausführlichere Erläuterung der verwendeten Algorithmen findet sich in [48–51]. Der für die Berechnungen in Kap. 7 verwendete Matlab-Code ist frei zugänglich und lässt sich unter [44] nach Installation mit Matlab nutzen.

5. Methoden zur Reduktion des Kalibrationsaufwands nach Blanco

Um mittels NIR-Spektrometrie den Gehalt von Wirk- und Hilfsstoffen in pharmazeutischen Formulierungen präzise vorhersagen zu können, ist es zwingend nötig die exakte Zusammensetzung der Kalibrationsproben zu kennen. Daher liegt auf dem verwendeten Probenmaterial besonderes Augenmerk. Hier soll nicht nur die chemische, sondern auch die physikalische Varianz abgebildet werden [52,53]. Damit Proben, die nicht mehr im Bereich festgelegter Spezifikationen (OOS) [54] liegen, zuverlässig erkannt werden können, muss eine Kalibration über einen gewissen Konzentrationsbereich erfolgen. Die ICH-Guideline Q2(R1) [55] gibt vor, dass für eine Kalibration der Gehalt des Wirkstoffs $\pm 20\%$ um den Nominalwert schwanken sollen. Je ähnlicher sich Kalibrationsdaten und Produktionsproben sind, desto besser wird die Vorhersageleistung des gebildeten Modells. In der pharmazeutischen Industrie werden 3 verschiedene Methoden zur Erzeugung der nötigen Variabilität in den Kalibrationsproben angewendet [52, 56, 57]:

1. Pilot-Proben:

simulieren aktuelle Produktionsproben (Gehalt und physikalische Eigenschaften)

2. Unter- und überdosierte Produktionsproben:

Es werden Proben mit mehr und weniger als die erwartete Arzneistoffmenge produziert, um den gewählten Konzentrationsbereich abzudecken.

3. Synthetische Laborproben:

Um die erwartete Spanne des Wirkstoffgehalts vorhersagen zu können, wird eine große Menge Proben mit gleichem Wirk- und Hilfsstoffgehalt produziert. So kann die gesamte Variabilität, die durch den Herstellungsprozess entsteht, im Modell abgebildet werden.

Anschauliche Beispiele für diese verschiedenen Vorgehensweisen zur Erstellung von NIR-Kalibrationsmodellen finden sich in [52].

Die drei vorgestellten Methoden zur Erzeugung von Kalibrationsproben haben allerdings einen Nachteil. Die Variationen aus dem extra erzeugten Proben set, welches für die Modellbildung herangezogen wird, decken sich nicht vollständig mit denen aus der zu kontrollierenden, laufenden Produktion. Dies führt zu höheren Vorhersagefehlern.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Blanco et al. [52] haben einen Ansatz entwickelt, die NIR als Absolut-Methode einzusetzen. Das bedeutet, dass keine orthogonale Gehaltsbestimmung wie zum Beispiel HPLC oder Titrationsverfahren nötig sind, um die für die quantitative Vorhersage nötigen Gehaltswerte der Kalibrationsproben zu liefern. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen, um zu überprüfen, ob diese Methode, deren Arbeitsaufwand deutlich geringer ist als der einer herkömmlichen NIR-Modelbildung, zu akzeptablen Ergebnissen führt. Der Ablauf wird im Folgenden beschrieben:

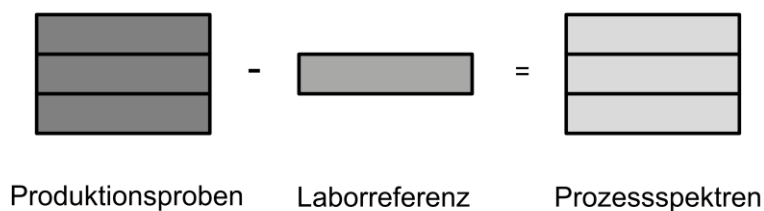


Abb. 5.1: Schritt 1: Erzeugen der Prozessspektren, modifiziert nach [52]. Diese Berechnung ist nur schematisch und folgt nicht den Regeln der Matrixalgebra. Erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

Im ersten Schritt (Abb. 5.1) werden die Prozessspektren aus der Differenz von „Produktionsproben“ und „Laborreferenz“ gebildet. Mehrere Chargen der Produktionsproben werden mit festgelegter Formulierung in zuvor definierten Produktionsschritten erzeugt. Die Laborproben werden als Pulvermischungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Wirk- und Hilfsstoffen exakt gewogen und gemischt. Die Konzentrationen wurden über ein D-optimales Design so ausgewählt, dass der zu kalibrierende Konzentrationsbereich aufgespannt wird.

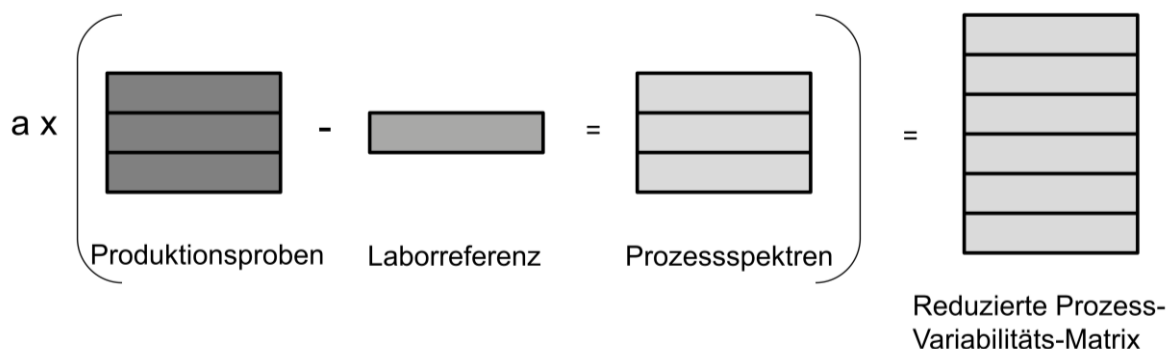


Abb. 5.2: Schritt 2: Erzeugen der reduzierten Prozess-Variabilitäts-Matrix im Beispiel $a=2$ Chargen, modifiziert nach [52] erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Als Laborreferenz wird hierbei ein Spektrum bezeichnet, dass den Laborproben entnommen wurde. Diese Probe enthält den Wirkstoff und alle Hilfsstoffe in derselben Konzentration wie auch die Produktionsproben. Dieses Vorgehen wiederholt Blanco [52] für insgesamt 3 verschiedene Spektren einer Charge. Im Schritt 2 (Abb. 5.2) erfolgt das Erzeugen der sogenannten reduzierten Prozess-Variabilitäts-Matrix indem aus a Chargen Proben nach obenstehender Anleitung bearbeitet werden.

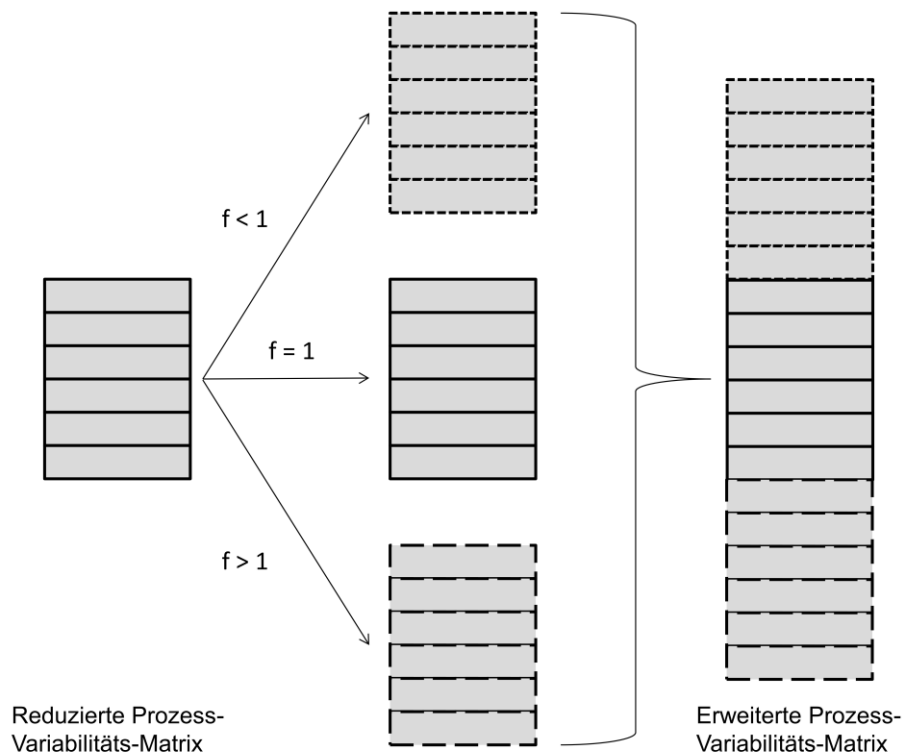


Abb. 5.3: Schritt 3: Erzeugen der erweiterten Prozess-Variabilitäts-Matrix, modifiziert nach [52]; erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

Im Schritt 3 (Abb. 5.3) wird die reduzierte Prozess-Variabilitäts-Matrix mit drei verschiedenen Faktoren f multipliziert um die Variabilität in den Prozessspektren zu erhöhen. Dabei ist mindestens ein Faktor $f = 1$ und die anderen beiden jeweils $f < 1$ und $f > 1$.

Nun wird in Schritt 4 (Abb. 5.4) auf jede Laborprobe ein Spektrum der reduzierten Prozess-Variabilitäts-Matrix zufällig addiert. Diese Matrix wird nun die „erweiterte totale Variabilitäts-Matrix“ genannt.

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

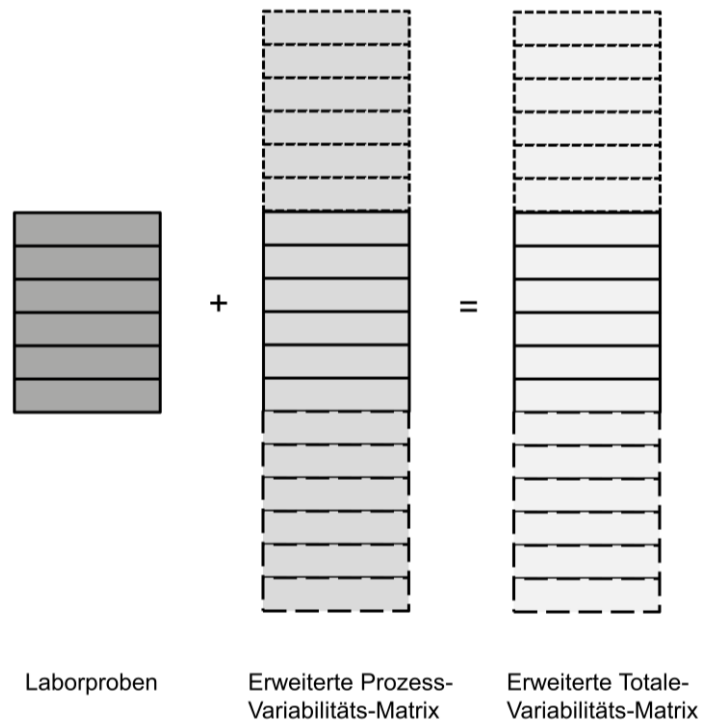


Abb. 5.4: Schritt 4: Erzeugen der erweiterten Totalen-Variabilitäts-Matrix, modifiziert nach [52]; Diese Berechnung ist nur schematisch und folgt nicht den Regeln der Matrixalgebra. Erstellt mit MicrosoftTMPowerPoint[®].

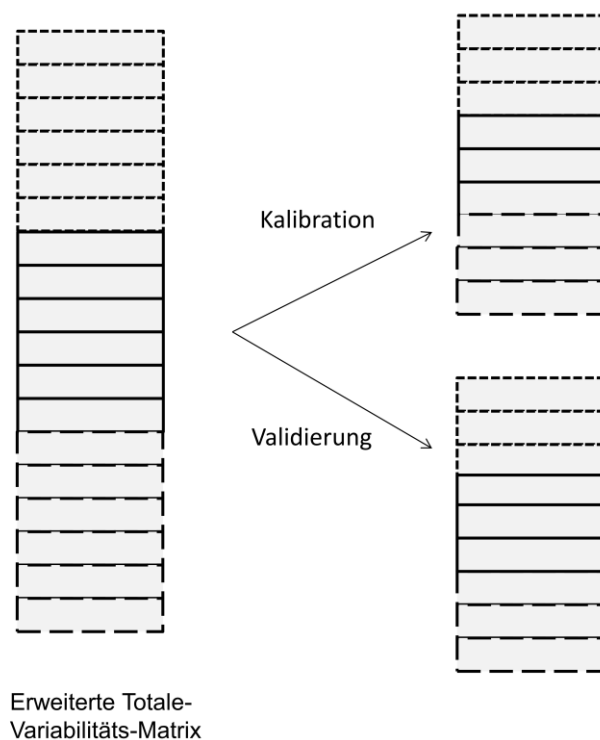


Abb. 5.5: Schritt 5: Erstellen eines Kalibrier- und Validierdatenset aus der erweiterten Totalen-Variabilitäts-Matrix, modifiziert nach [52]; erstellt mit MicrosoftTMPowerPoint[®].

I. Einleitung und theoretische Grundlagen

Der letzte Schritt (Abb. 5.5) besteht in der Teilung des erstellten Datensatzes in Kalibrier- und Validierdaten. In Anlehnung an [52] wird auch in der vorliegenden Arbeit das Kalibrationsmodell mittels PLS (s. Kap. 4.3) unter Zuhilfenahme einer Leave-One-Out Kreuzvalidierung (s. Kap. 4.5) erstellt.

6. Stabilitätsuntersuchungen nach ICH Q1A (R2)

Die „International Conference on Harmonisation“ (ICH) erstellt Leitlinien, die zur Vereinheitlichung der Beurteilungskriterien für die Zulassung von Humanarzneimitteln führen. Diese ausgearbeiteten Regeln gelten für Europa, die USA und Japan.

In mehrstufigen Verfahren wurden seit 1990 die Leitlinien für die Bewertung von Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit, die die Grundlage für die Zulassung von neuen Arzneimitteln darstellen, entwickelt [58].

Die ICH-Richtlinie Q1 R2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Typen von Stabilitätstests. Hier können, je nach Versuchsplanung verschiedene Ziele verfolgt werden. Im Rahmen der Entwicklung von Arzneimitteln lassen sich z.B. Erkenntnisse über entstehende Abbauprodukte gewinnen und dementsprechend angepasste Prüfverfahren entwickeln. Weiterhin werden bei der Durchführung dieser Tests Daten für die Zulassung von Arzneimitteln gesammelt. Die verschiedenen Stabilitätsstudien lassen sich grob in Stresstest- und Echtzeitstudien gliedern. In den Stresstests werden die Lagerbedingungen so verändert, dass Alterungsprozesse in dem gelagerten Produkt schneller ablaufen. Durch diese Veränderung kann man nun Echtzeitdaten extrapolieren. In dieser Richtlinie wurden neben zu prüfenden Spezifikationen auch Lagerungsbedingungen in verschiedenen Klimazonen festgelegt. Weiterhin sind Anleitung zur Erstellung und Dokumentation von Prüfplänen und Ergebnissen hinterlegt.

In Kapitel 8 wird die Anleitung über die beschleunigte Langzeitstudie von Arzneimitteln beschrieben. Hiermit war es möglich, über einen relativ kurzen Zeitraum gealterte Proben zu gewinnen und vermessen zu können.

II. Experimenteller Teil

7. Wirkstoffvorhersage aus Tablettenspektren

Arzneimittel sind Waren von besonderer Güte. Eine hohe und gleichbleibende Qualität bei ihrer Herstellung ist also von essentieller Bedeutung. Diese zu gewährleisten stellt einen hohen finanziellen, personellen und zeitlichen Aufwand dar. Neben den sehr hohen Entwicklungskosten macht dies Arzneimittel im Vergleich zu anderen Gütern des täglichen Bedarfs sehr teuer. Deshalb sind Arzneimittel für Fälscherbanden attraktiv, da sich hier mit geringem Einsatz sehr hohe Gewinne erzielen lassen. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2006 zufolge liegt die Rate der gefälschten Arzneimittel lediglich bei $< 1\%$ in hoch entwickelten Ländern, schwankt jedoch zwischen 10 und 60% in Afrika, Asien, Lateinamerika und der ex-UdSSR. Eine weitere Quelle von Arzneimittelfälschungen bilden unseriöse Internetangebote. Dabei ist die Bandbreite der Fälschungen groß. Als gefälscht gilt ein Arzneimittel bereits, wenn lediglich der Beipackzettel oder die Umverpackung ohne Genehmigung verändert wurde. Gefährlich wird es jedoch dann, wenn die Fälschung eine andere als die deklarierte Dosis des Wirkstoffes, einen anderen oder gar keinen Wirkstoff enthält. So wurde beispielsweise 1997 in Kenia das Malariamedikament Metakelfin® in großem Stil gefälscht. Anstatt der Wirkstoffkombination Sulfadoxin und Pyrimethamin enthielten die Tabletten nur Paracetamol [59]. Um Arzneimittel in Ländern der Dritten Welt vor Ort möglichst einfach auf Fälschungen überprüfen zu können, wurde das GPHF-Minilab® vom Global Pharma Health Fund e.V. entwickelt [60]. Es kombiniert Farbreaktionen und dünnschichtchromatographische Untersuchungen um über 40 Wirkstoffe identifizieren zu können. Dieses System bietet die Möglichkeit Arzneimittel in Ländern zu untersuchen, wo die Arzneimittelqualität nicht so stark überprüft wird wie zum Beispiel in Deutschland. Die Handhabung des GPHF-Minilab erfordert gut geschultes Personal, da es sich um klassische Nasschemie handelt.

Eine Alternative könnte die NIRS bieten [61]. Dafür ist es allerdings notwendig, aus Mischspektren die einzelnen Reinspektren zuverlässig herauszurechnen, was mit Hilfe spezieller mathematischer Computerprogramme heutzutage durchaus möglich ist [62,63]. In der vorliegenden Arbeit wird dazu und das in Kap. 4.6 beschriebene frei

II. Experimenteller Teil

zugängliche Programm MCR-ALS für Matlab verwendet [44]. Hier soll überprüft werden, ob es auch die Möglichkeit bietet, den Wirkstoff in einer Tablette mathematisch zu ermitteln. Im folgenden Abschnitt werden die drei durchgeführten Versuche beschrieben. Die Probenqualität nimmt bezogen auf die Anzahl der Komponenten von Versuch zu Versuch zu.

7.1. Zweikomponentengemisch

7.1.1. Proben

Für diesen Vorversuch wird ein Zweikomponentengemisch verwendet, welches aus Ciprofloxacin und mikrokristalliner Cellulose (MCC) in unterschiedlichen Verhältnissen besteht. Zuerst wurden jeweils die Reinstoffe in Vials gefüllt und dreifach mit dem Büchi NIRFlex N500 in diffuser Reflexion mittels Vialaufsatz vermessen. Die weiteren Mischungen der beiden Substanzen wurden laut Tabelle 7.1 hergestellt.

Tab. 7.1: Mischungsverhältnis des Zweikomponentengemisches bestehend aus Ciprofloxacin und MCC

Ciprofloxacin Gehalt [%]	MCC Gehalt [%]
10	90
50	50
90	10

Die Mischung wird auf der Analysenwaage direkt in das Vial eingewogen und 60 Sekunden mit der Hand geschüttelt um Homogenität zu erreichen. Die Mischzeit wurde empirisch ermittelt. Die Probe gilt als homogen, wenn das NIR-Spektrum von drei aufeinanderfolgenden Proben identisch ist. Eine Testcharge wurde zuvor nach den obenstehenden Kriterien erstellt. Alle Messungen wurden mit einer Auflösung von 4cm^{-1} in diffuser Reflexion aufgenommen. Nach der Startmessung folgt ein gleichmäßiges Schütteln für 10 Sekunden mit im Anschluss stattfindender NIR-Messung. Sobald annähernd identische Spektren resultieren, wird der Mischvorgang gestoppt. Hierbei stellte sich eine Zeit von 60 Sekunden zur Gewinnung einer optimalen Mischgüte heraus.

7.1.2. Spektren

Bevor die Spektren mittels dem für Matlab verfügbaren MCR-ALS Programm von Tauler [44] untersucht werden können, werden die Daten zuerst einer Datenvorbehandlungsmethode unterzogen. Hierzu wird als Streulichtkorrektur (siehe Kap. 4.1.3) die Standardisierung gewählt.

Abbildung 7.1 zeigt die Originalspektren, die jeweils pro Farbe das 3-fach vermessene Konzentrationsniveau darstellen.

Diese Daten stellen die Basis für die Berechnungen dar.

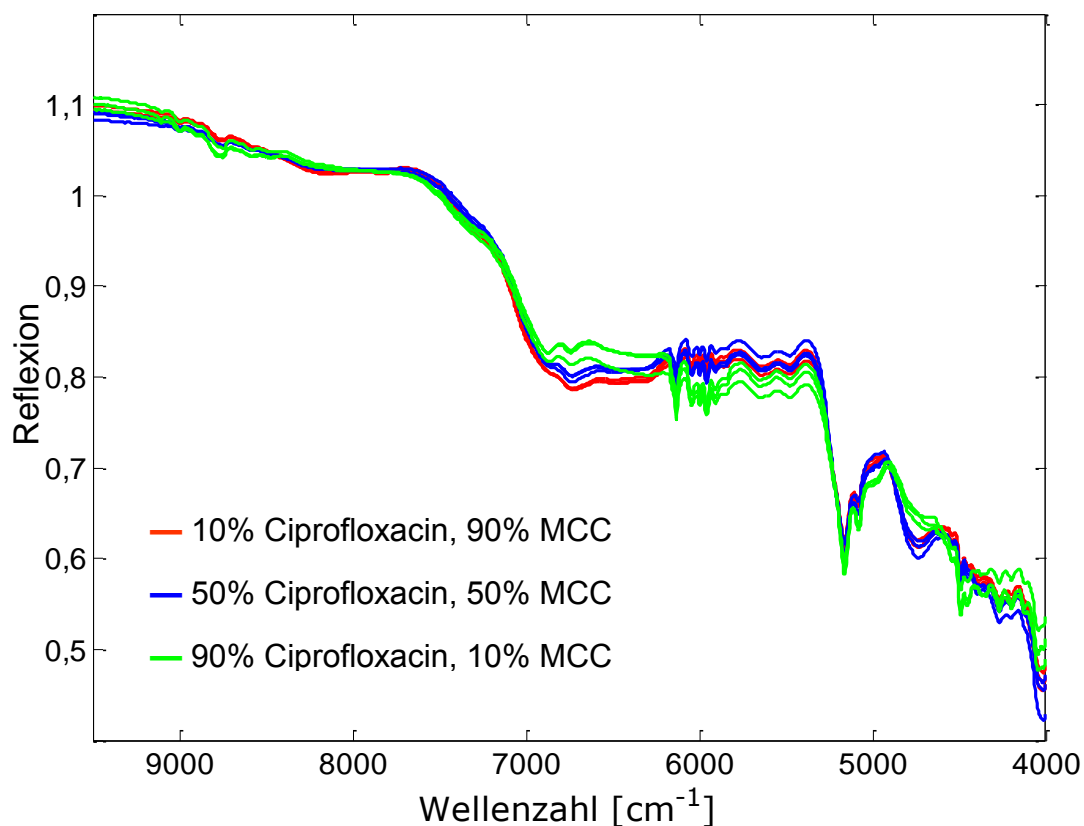


Abb .7.1: Datenmatrix D: Zweikomponentengemisch, bestehend aus unterschiedlichen Anteilen Ciprofloxacin und MCC.

7.1.3. Ergebnisse

Die Vorhersage von Ciprofloxacin im Zweikomponentengemisch erscheint rein visuell (siehe Abbildung 7.2) recht gut gelungen. Allerdings weist das Spektrum deutliche Einflüsse des MCC Spektrums auf. Insbesondere in den Wellenzahlbereichen 6500-7000 cm^{-1} und circa 5750 cm^{-1} sind deutliche Abweichungen vom Verlauf des Reinspektrums Ciprofloxacin zu erkennen.

II. Experimenteller Teil

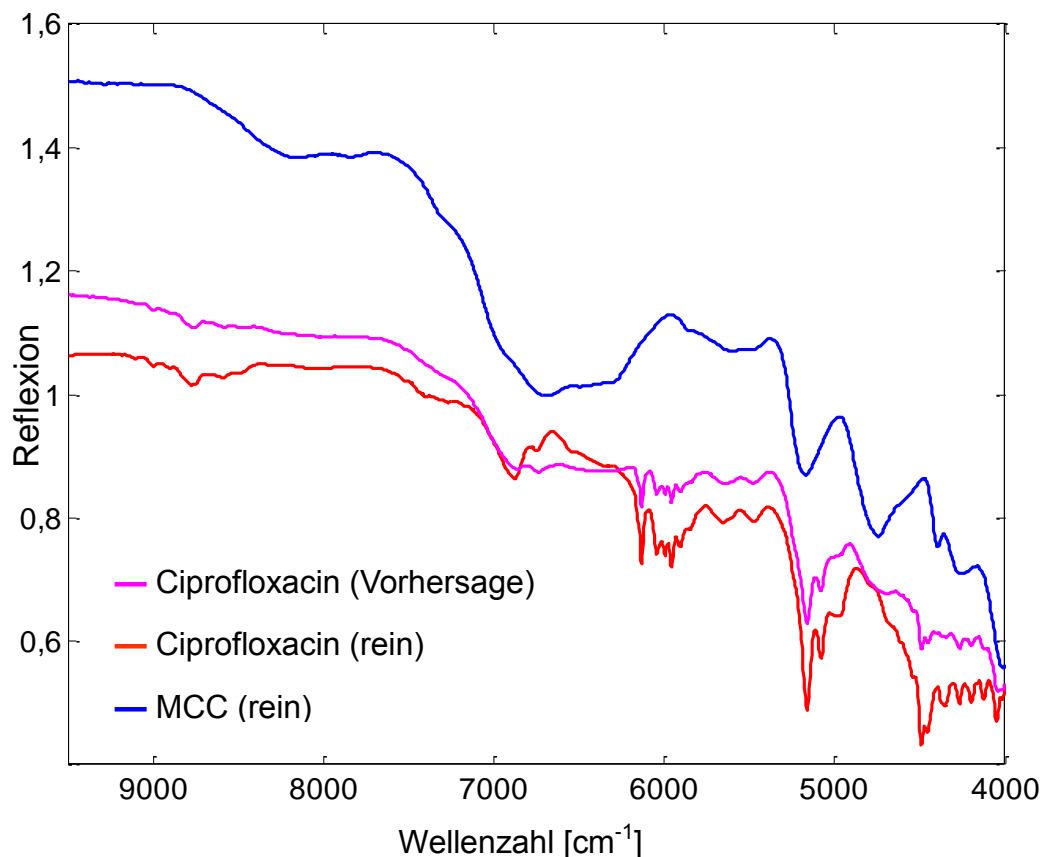


Abb. 7.2: Zweikomponentengemisch Ciprofloxacin mit MCC. Vorhersage des Spektrums von Ciprofloxacin mit MCC als Vorgabe.

Die Konzentrationsprofile für die hohen und niedrigen Konzentrationen der beiden Komponenten ließen sich, relativ korrekt vorhersagen (siehe Abb. 7.3). Dabei wurde das Spektrum von MCC als Bedingung für die Vorhersage des Ciprofloxacin-Spektrums gesetzt und umgekehrt. Allerdings zeigt die Vorhersage für die Konzentrationen der Spektren 4 bis 6 eine deutliche Abweichung von den eigentlichen Konzentrationswerten von je 50% pro Komponente.

Auch der Korrelationskoeffizient in Tabelle 7.1 verdeutlicht die Probleme, die bereits in Abbildung 7.2 diskutiert wurden. Hier lässt sich zeigen, dass die Korrelation zwischen dem Mittelwertspektrum und dem vorhergesagten Arzneistoff höher ist als die Korrelation von Ciprofloxacin und der entsprechend vorhergesagten Komponente.

II. Experimenteller Teil

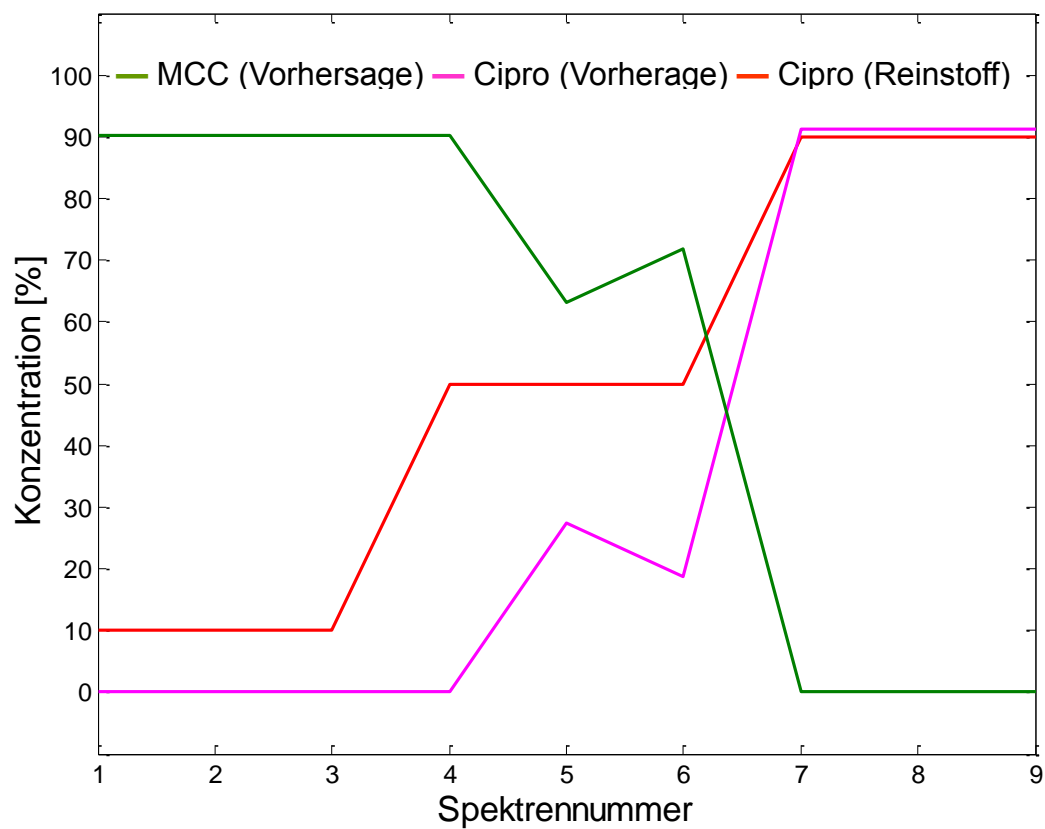


Abb. 7.3: Zweikomponentengemisch Ciprofloxacin mit MCC. Vorhersage der Konzentrationsprofile von Ciprofloxacin und MCC.

Tab. 7.1: Korrelationskoeffizienten Datenmatrix zu Ciprofloxacin

Korrelation	Mittelwert Datenmatrix	Reinsubstanz Ciprofloxacin	Vorhersage Ciprofloxacin
Mittelwert Datenmatrix	1	0,96632	0,99906
Reinsubstanz Ciprofloxacin	0,96632	1	0,9759
Vorhersage Ciprofloxacin	0,99906	0,9759	1

7.2 Ibuprofen-Tabletten

7.2.1 Proben

Die nächste Versuchsreihe besteht aus 6 verschiedenen Chargen selbstgepresster Ibuprofen-Tabletten unterschiedlicher Zusammensetzung (Tab. 7.2). Die Substanzen wurden auf der Analysenwaage gewogen und 10 Minuten im Kubusmischer gemischt. Dann wurde die Mischung mittels Korsch Exzenterpresse ohne weitere Verarbeitung verpresst.

Hierbei wurde zuerst die Bruchfestigkeit der Tabletten auf 80 – 90 N eingestellt und dann die Tabletten direkt tablettiert.

Tab. 7.2: Zusammensetzung der 6 verschiedenen Chargen Ibuprofen-Tabletten.

Ibuprofen [g]	CaHPO ₄ [g]	MCC [g]	Aerosil [g]
0	89	10	1
10	79	10	1
20	69	10	1
30	59	10	1
40	49	10	1
50	39	10	1

Pro Charge wurden je 25 Tabletten 3-fach vermessen. Aus diesen 3 Spektren wurde dann ein Mittelwertspektrum errechnet. So resultieren für die 6 Chargen 150 Spektren, die dann für die mathematische Weiterverarbeitung mittels SNV als Streulichtkorrektur (siehe Kap.4.1.3.) vorbehandelt wurden.

7.2.2 Spektren

In diesem Versuchsteil werden die Spektren zuerst mittels SNV als Streulichtkorrektur (4.1.3) vorbehandelt, bevor die MCR-ALS angewendet wird. Hierbei wird das Reinstoffspektrum von CaHPO₄ als Nebenbedingung eingesetzt. Abbildung 7.4 zeigt die Originalspektren, hier je 25 Mittelwertspektren pro Ibuprofen-Konzentration.

II. Experimenteller Teil

Der Einfluss von der Erhöhung des Anteils Ibuprofens an der Gesamtmasse spiegelt sich in der Veränderung des entsprechenden Tablettenspektrums wider.

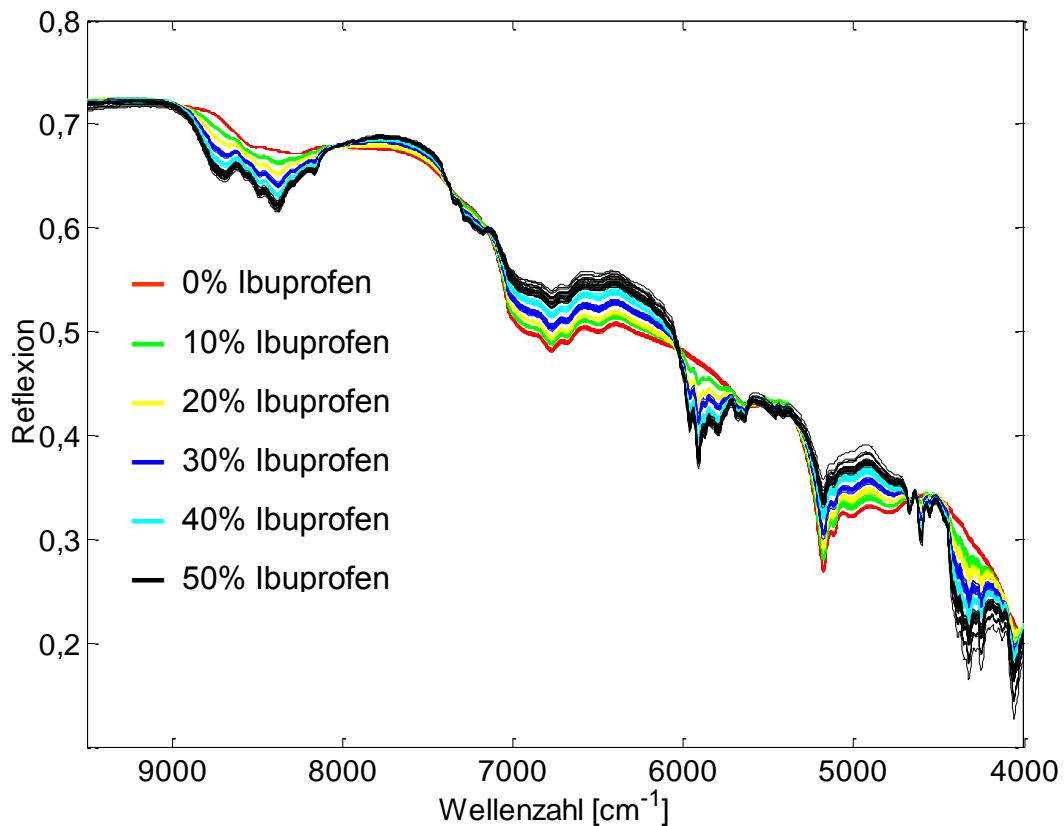


Abb. 7.4: Originaldaten Ibuprofen-Tabletten. Die SNV wurde zur Streulichtkorrektur als Datenvorbehandlung eingesetzt.

7.2.3 Ergebnisse

Rein visuell ist in diesem Versuch ist die Vorhersage von Ibuprofen aus den selbstproduzierten Tabletten (siehe Abbildung 7.5) recht gut gelungen. Auch hier weist jedes Spektrum veränderte Einflüsse der Hilfsstoffspektren in Abhängigkeit von deren Konzentration auf. Insbesondere in den Wellenzahlbereichen 6750 cm^{-1} und circa 5250 cm^{-1} sind deutliche Abweichungen vom Verlauf des Reinspektrums Ibuprofen zu erkennen.

Der berechnete Korrelationskoeffizient in Tabelle 7.3 zeigt, dass die Korrelation zwischen dem Mittelwertspektrum aller vermessenen Spektren und dem vorhergesagten Arzneistoffspektrum minimal höher ist als die Korrelation von Ibuprofen-Reinspektrum und dem vorhergesagten Arzneistoffspektrum.

II. Experimenteller Teil

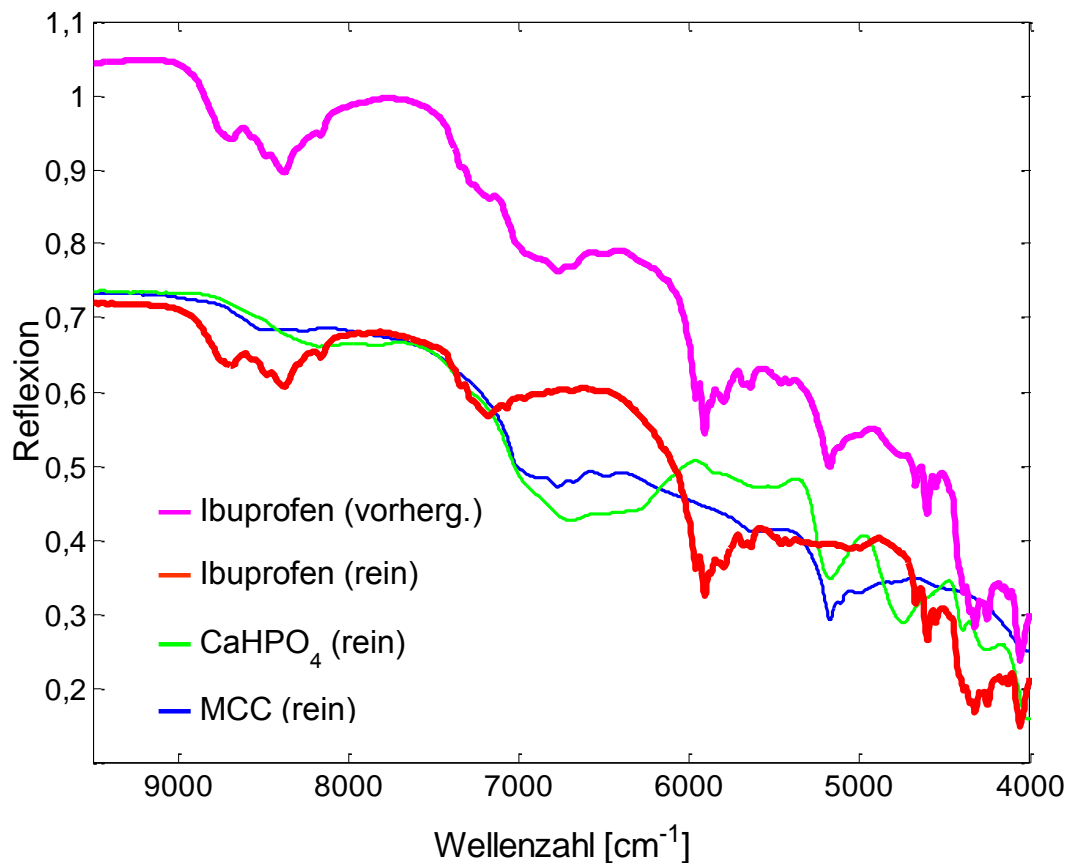


Abb. 7.5 : Darstellung der Reinstoffspektren und des vorhergesagten Ibuprofen-Spektrums

Tab. 7.3: Korrelationskoeffizienten Datenmatrix zu Ibuprofen

Korrelation	Mittelwertspektrum Gesamtmatrix	Reinstoff Ibuprofen	Vorhersagespektrum Ibuprofen
Mittelwertspektrum Gesamtmatrix	1	0,96554	0,99367
Reinstoff Ibuprofen	0,96554	1	0,98583
Vorhersagespektrum Ibuprofen	0,99367	0,98583	1

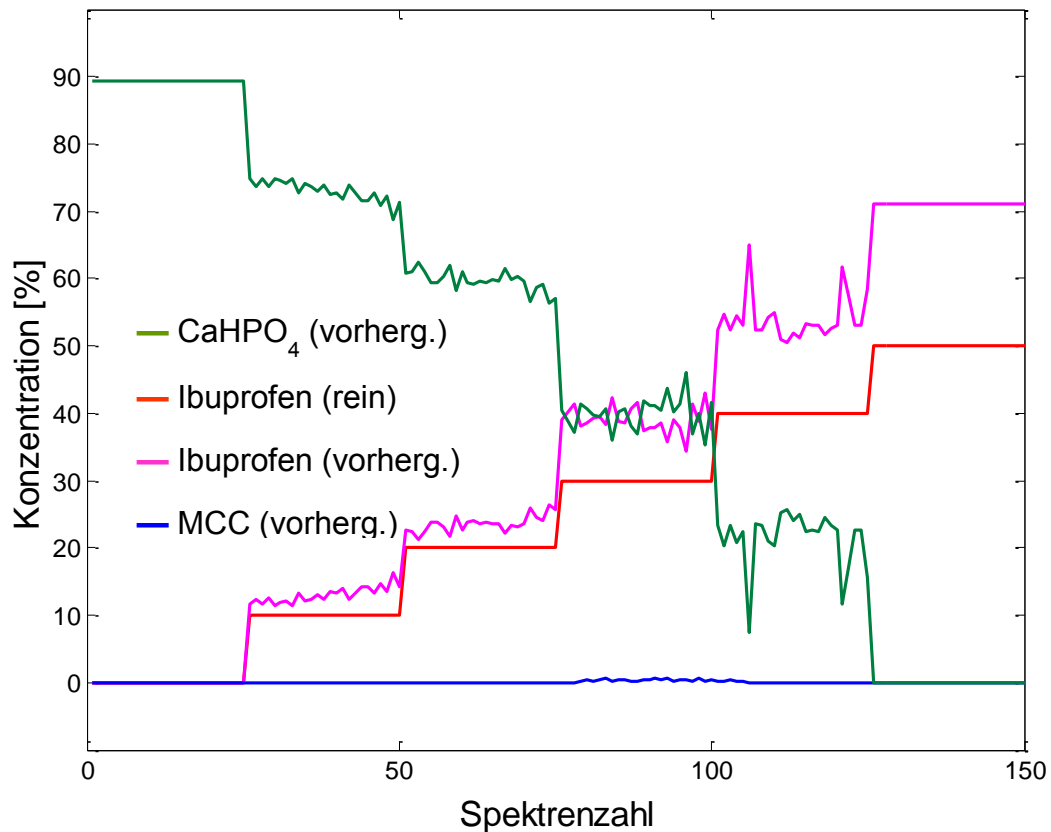


Abb. 7.6: Darstellung der Reinstoffspektren und des vorhergesagten Ibuprofen-Spektrums. Das Konzentrationsprofil wurde mittels MCR-ALS errechnet. Hierzu wurde zur Berechnung der Ibuprofen-Konzentration CaHPO_4 als Nebenbedingung eingesetzt.

Wenn CaHPO_4 als Nebenbedingung zur Berechnung des des Konzentrationsprofils von Ibuprofen mittels MCR-ALS (siehe Kap. 4.6) eingesetzt wird, kann der treppenförmige Verlauf gut errechnet werden. Allerdings ergibt sich hierbei eine ca. 20% igen Abweichung bei der Vorhersage (Abb. 7.6).

7.3 Ramipril-Tabletten

7.3.1 Proben

Für die letzte Versuchsreihe wurde bewusst ein Fertigarzneimittel mit geringem Wirkstoffanteil gewählt. Hierbei handelt es sich um ein Ramipril-Präparat der Firma Sanofi-Aventis Deutschland GmbH. Die genaue Zusammensetzung und die Kenndaten zu den einzelnen verwendeten Präparaten lassen sich Tabelle 7.4 entnehmen.

II. Experimenteller Teil

Tab. 7.4: Kenndaten der verwendeten Ramipril-Tabletten entnommen aus der Roten Liste online

Präparat	Zusammensetzung	Kenndaten
Delix [®] 2,5 mg	Ramipril (2,5mg) Hypromellose vorverkleisterte Maisstärke mikrokristalline Cellulose Natriumstearyl fumarat Eisen(III)-hydroxid	Breite: 4,0 mm Länge: 8,0 mm Gewicht: 100 mg
Delix [®] 5 mg	Ramipril (5mg) Hypromellose vorverkleisterte Maisstärke mikrokristalline Cellulose Natriumstearyl fumarat Eisen(III)-hydroxid	Breite: 4,0 mm Länge: 8,0 mm Gewicht: 100 mg
Delix [®] protect 10 mg	Ramipril (10mg) Hypromellose vorverkleisterte Maisstärke mikrokristalline Cellulose Natriumstearyl fumarat	Breite: 4,5 mm Länge: 7,0 mm Gewicht: 100 mg

Pro Fertigarzneimittel wurden 10 Tabletten einer Charge verwendet. So resultieren bei einer Dreifachmessung jeder Tablette pro Charge 30 und insgesamt 90 Tablettenspektren. Da das Gewicht der drei Tabletten gleich groß ist, steigt der prozentuale Anteil des Wirkstoffes in den Tabletten an. Das lässt den Schluss zu, dass dies auch in einer Variation der Spektren deutlich werden sollte.

7.3.2 Spektren

Bei diesen drei Fertigarzneimitteln handelt es sich um jeweils denselben Arzneistoff und identische Hilfsstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen, ist der Einfluss der Variation des Wirkstoffgehalts auf das Gesamtspektrum nicht sehr groß (Abb. 7.7). Genauso wie in den vorangehenden beiden Versuchsteilen wurde auch hier vor der weiteren Bearbeitung durch MCR-ALS (siehe Kap.4.6.) eine SNV als Streulichtkorrektur (siehe Kap. 4.1.3.) durchgeführt.

II. Experimenteller Teil

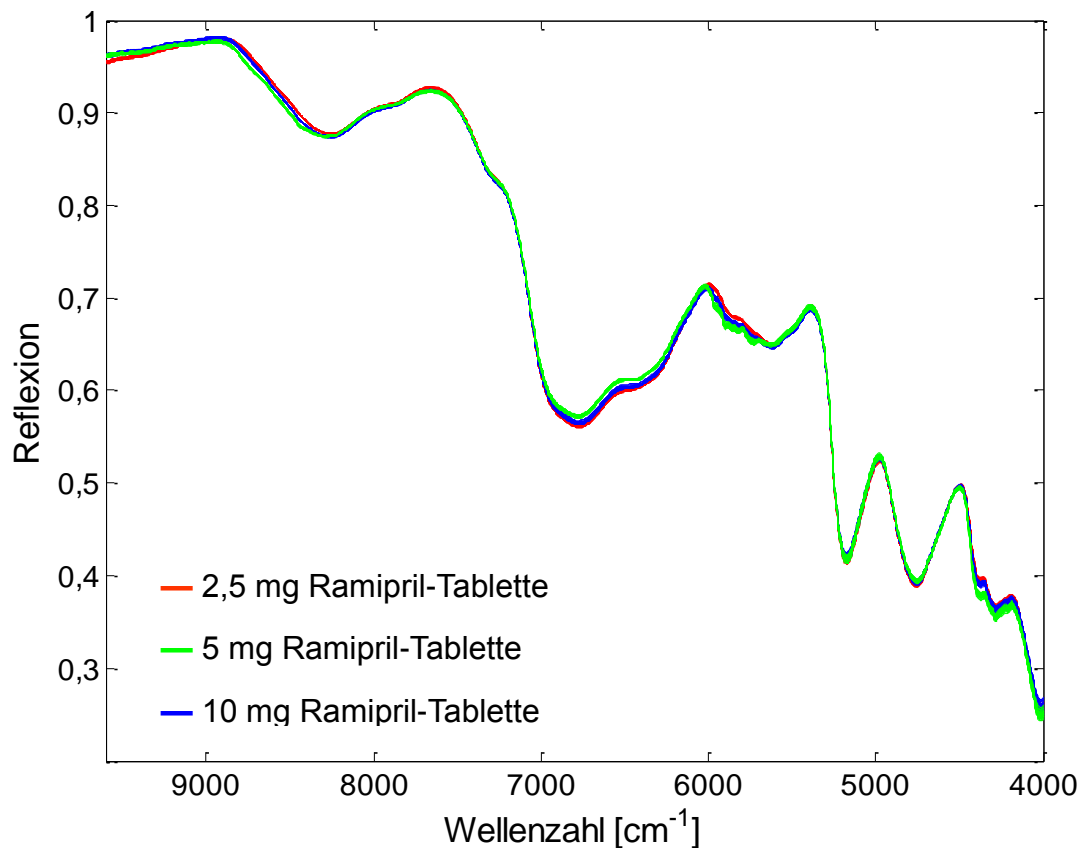


Abb.7.7: Originalspektren der drei verschiedenen Delix[®]-Präparate. Dabei wurde als Datenvorbehandlungsmethode die SNV als Streulichtkorrektur durchgeführt.

7.3.3 Ergebnisse

Da in diesem Fall die Bezeichnung der Hilfsstoffe Hypromellose und vorverkleisterte Maisstärke nicht sehr genau sind, da durch den Produktionsprozess verschiedene Substanzen existieren, ist es schwer ein Original-Hilfsstoffspektrum aus der Produktion als Nebenbedingung einsetzen zu können.

Daher resultieren sehr schlechte Ergebnisse bezüglich der Vorhersage des Arzneistoffes (Abb. 7.8). Das vorhergesagte Spektrum ähnelt mehr dem der Maisstärke mehr als dem des Ramiprils. Auch die Korrelationsberechnung (Tab. 7.5) erreicht kein so gutes Ergebnis wie in den beiden vorangegangenen Experimenten. Hier ist die vollständige Korrelation des vorhergesagten Spektrums mit dem Mittelwert erreicht, die Korrelation mit dem Ramipril-Spektrum liegt allerdings nur bei 0,90842. Das Konzentrationsprofil des Ramiprils zeigt kaum Schwankungen (Abb.

II. Experimenteller Teil

7.9) und auch nicht den richtigen Verlauf. Daher muss man sagen, dass es in diesem Teil der Versuchsreihe leider nicht möglich war ein akzeptables Ergebnis zu erhalten.

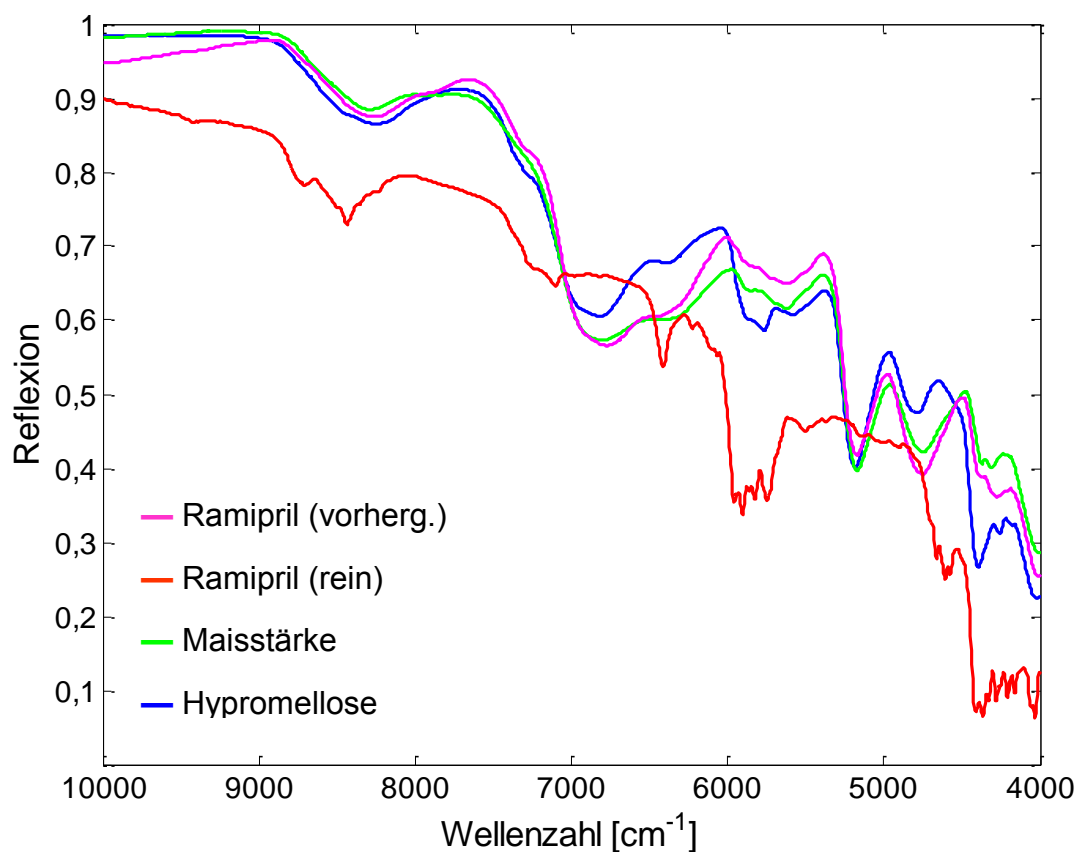


Abb. 7.8: Darstellung der Vorhersage des Ramipril-Spektrums.

Tab. 7.5: Korrelationskoeffizienten Datenmatrix zu Ramipril

Korrelation	Mittelwertspektrum Gesamtmatrix	Reinstoff Ramipril	Vorhersagespektrum Ramipril
Mittelwertspektrum Gesamtmatrix	1	0,90842	1
Reinstoff Ramipril	0,90842	1	0,90842
Vorhersagespektrum Ramipril	1	0,90842	1

II. Experimenteller Teil

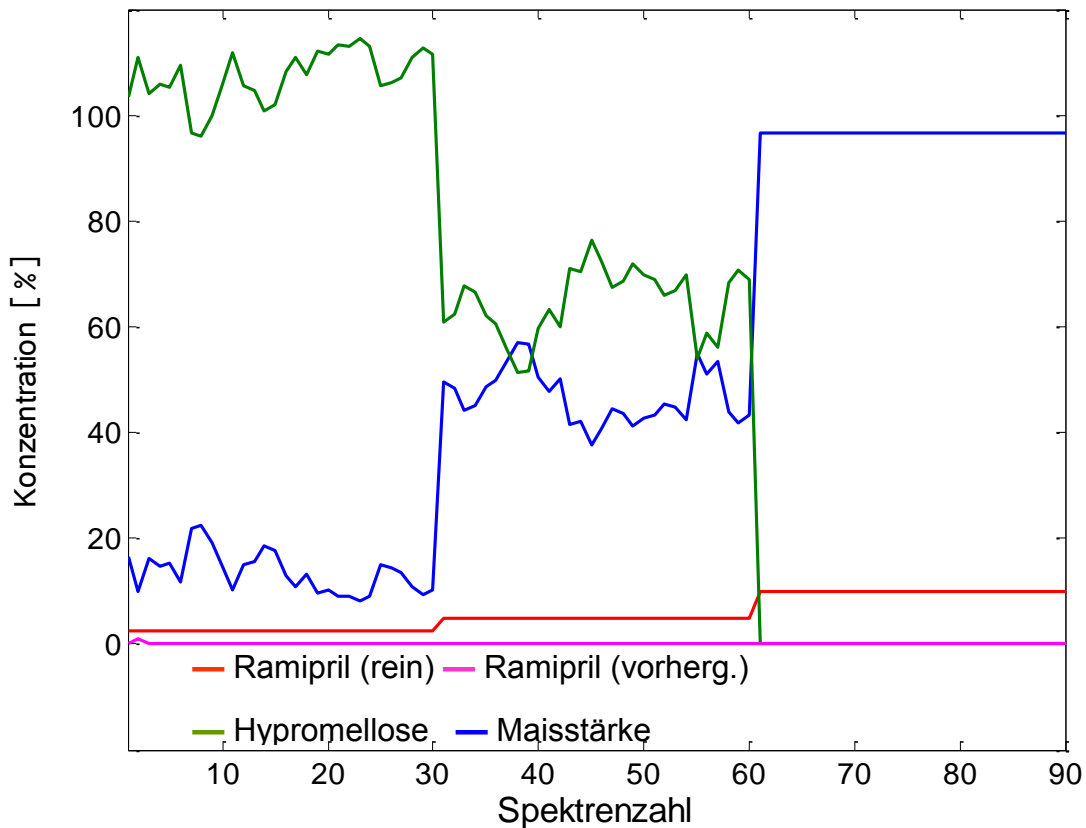


Abb. 7.9: Darstellung der Vorhersage des Konzentrationsprofils für das Fertigarzneimittel Delix®

7.4 Zusammenfassung

Die Versuchsergebnisse des Kapitels 7 zeigen, dass es durchaus möglich ist ein NIR-Reinspektrum eines Arzneistoffs aus einem Gemisch oder auch aus einer Tablette vorherzusagen. In einem Zweikomponentengemisch lassen sich sowohl das Wirkstoffspektrum mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9759 als auch der Verlauf des Konzentrationsprofils berechnen. Wenn nun allerdings der Wirkstoff aus Tablettenpektren berechnet werden soll, wie im Beispiel Ibuprofen, ist es zwingend nötig, dass die Konzentrationsänderung des Wirkstoffes in der Mischung ausreichend groß ist. Nur so kann sich das Mittelwertspektrum bei verschiedenen Konzentrationsniveaus signifikant verändern. Im Falle von Ibuprofen lässt dann sich ein Wirkstoffspektrum vorhersagen, welches einen Korrelationskoeffizienten von 0,9858 zum Reinspektrum besitzt. Der Verlauf des Konzentrationsprofils im Ibuprofen-Versuch lässt sich mit einem relativen Fehler von ca. 20% berechnen. Wird allerdings eine Probe untersucht dessen vorherzusagender Wirkstoff mit einer

II. Experimenteller Teil

Konzentration $\leq 10\%$ der Gesamtmasse enthalten ist, wie im Beispiel der Ramipril-Tabletten, ist die Erstellung eines Wirkstoffspektrums unter den vorliegenden Bedingungen nicht möglich. Erst mit höheren Konzentrationen des Wirkstoffs im Gemisch ist es möglich, über das MCR-ALS (siehe 4.6) unter der Vorlage eines Hilfsstoffes ein Wirkstoffspektrum und einen verlässlichen Verlauf des Konzentrationsprofils zu berechnen.

Um nun bei unbekannten Proben eine Aussage über den Arzneistoff treffen zu können, muss der Korrelationskoeffizient des vorhergesagten Spektrums zu Wirkstoffen, die sich in einer Datenbank befinden, berechnet werden. So ließen sich Arznei- und Hilfsstoffe alternativ zum GPHF-Minilab[®] identifizieren.

Problematisch bei unbekannten Proben ist allerdings, dass es keine allgemeingültige Datenbank für NIR-Spektren aller Wirk- und Hilfsstoffe gibt [61]. Daher ist es schwierig, den Arzneistoff zu ermitteln, wenn die Hilfsstoffe nicht als Nebenbedingung eingesetzt werden können. Wird allerdings eine solche Datenbank verfügbar sein, ist es möglich mit den bestehenden chemometrischen Methoden eine Vorhersage mit höherer Genauigkeit zu erreichen. Dabei muss allerdings auch als eine weitere Bedingung die Zusammensetzung der unbekannten Probe bekannt sein.

8. Alterung von Antibiotika-Tabletten

Wie bereits erwähnt sind Arzneimittel Produkte von höchster Qualität. Daher wird ihre Herstellung streng überwacht und die Qualität für die Freigabe geprüft. Ferner muss die Stabilität des erzeugten Produktes bei einer simulierten Alterung unter definierten Lagerbedingungen überprüft werden, damit die Qualität des Arzneimittels bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum gewährleistet werden kann.

Für diese Stabilitätskontrolle werden heutzutage in der Regel die bewährten chromatographischen Methoden (HPLC, DC), sowie Titrations angewendet.

Bei diesen Verfahren ist es häufig notwendig vor der eigentlichen Analyse den Arzneistoff von den Hilfsstoffen, der sogenannten Matrix, vollständig abzutrennen.

Dieses ist meist ein aufwendiger und deshalb zeit- und kostenbestimmender Schritt.

Das Ziel der Arbeit ist es, ein NIR-Model zu entwickeln, mit Hilfe dessen der Gehalt von Amoxicillin-Tabletten zu unterschiedlichen Lagerzeitpunkten direkt bestimmt werden kann und somit die aufwendige Probenvorbereitung entfällt.

8.1 Projektplanung

8.1.1 Prüfparameter

Zuerst werden die organoleptischen Charakteristika, also das Aussehen und der Geruch der Tabletten bestimmt. Des Weiteren wird die Masse jeder Tablette ermittelt und eine Gehaltsbestimmung durchgeführt.

Die Tabletten werden mittels diffuser Reflexion per Nahinfrarotspektroskopie (NIR) vermessen. Als Referenzmethode wird die Gehaltsbestimmung für Amoxicillin-Trihydrat, in Anlehnung an die entsprechende Monographie des Europäischen Arzneibuchs 6.0 mittels HPLC durchgeführt.

8.1.2 Proben

Bei den Proben handelt es sich um Amoxicillin STADA® 1000mg Filmdtabletten (PZN 2760548), mit der Chargennummer 8774 und dem Haltbarkeitsdatum 01/2011.

Eine Tablette enthält als Wirkstoff 1148 mg Amoxicillin-Trihydrat (entspr. 1000 mg Amoxicillin) und folgende Hilfsstoffe: Basisches Butylmethacrylat-Copolymer, Carboxymethylstärke-Natrium (Typ A), Macrogol 6000, Magnesiumstearat, Maisstärke, Povidon K 25, hochdisperses Siliciumdioxid, Talkum, Titandioxid (E 171).

8.1.3 Lagerbedingungen und Probenzug

Bei der Auswahl der Lagerbedingungen wird darauf geachtet, dass Temperatur und Luftfeuchtigkeit nach den gültigen ICH-Richtlinien für Stabilitätsprüfungen Q1A(R2) und Q1F eingestellt werden [55,64].

Es wird die beschleunigte Lagerungsstudie gewählt, bei der die Tabletten mit $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ und $75\% \pm 5\%$ relative Luftfeuchte im Klimaschrank KBF 240 der Fa. Binder für 6 Monate gelagert werden.

Der Probenzug erfolgt zum Zeitpunkt 0 (05.05.2010) und dann jeweils in den Monaten 1, 3, 6. Damit wird auch hier die Frequenz der Probenzüge für die beschleunigte Lagerstudie erfüllt.

8.2 Versuchsdurchführung

8.2.1 Versuchsdurchführung NIR

Für die NIR-Messungen in Reflexion wird das NIRFlex N500 mit der Messzelle „Solids“ verwendet. Für die Messung der Tabletten wird der XL-Aufsatz (oder auch XL-Add-on) verwendet. Die Pulver werden mittels Halter für Vials, dem Vial-Add-on vermessen. Im Messbereich von 10000 bis 4000 cm^{-1} werden 1501 Datenpunkte in 4 cm^{-1} Schritten aufgenommen. In den folgenden beiden Abschnitten wird beschrieben, wie die Aufarbeitung der Proben erfolgt. Obwohl NIR-Spektren zerstörungsfrei aufgenommen werden können, müssen die Proben für die Gehaltsbestimmung mittels HPLC gemörstert werden. Es liegt daher nahe, auch noch ein Pulverspektrum zu vermessen. Da für jede vermessene Tablette eine Gehaltsbestimmung erfolgt, muss beim Vergleich der Daten berücksichtigt werden, dass jede Tablette nur für einen einzigen Probenzug zu Verfügung steht. Für jeden weiteren Probenzug werden jedoch Proben der gleichen Grundgesamtheit verwendet, sodass eine Auswertung möglich wird.

Messung der Tablette

Die ausgeblisterten Tabletten werden direkt auf das „XL-Add-on“ aufgelegt und drei Mal vermessen. Für jede Messung werden 64 Scans durchgeführt. Da die genaue



Positionierung der Tablette von entscheidender Bedeutung für die Auswertung ist, wurde eine Schablone angefertigt und die Tabletten von 4 Seiten auf 3 verschiedene Weisen vermessen, so dass pro Tablette 18 Spektren resultieren siehe Abb. 8.2.

Abb. 8.1: Beispielhafte Darstellung einer Amoxicillin-Tablette (Quelle: gelbe Liste)

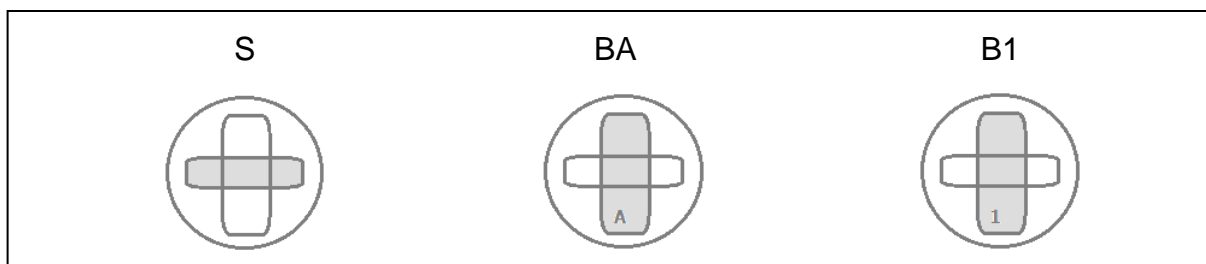


Abb. 8.2: Schablone für die Positionierung der Tablette auf dem XL- Aufsatz für die Messzelle „Solids“ des NIRFlex N 500. In Position S wird die Tablette mit dem Steg auf den grauen Ausschnitt gelegt. Für Position BA wird die Tablette mit der konvexen Seite auf den Ausschnitt gelegt. Dabei zeigt die Prägung A der Tablette nach oben. Die Position B1 wird durch Drehen der Position BA erzielt. Nun zeigt die Prägung 1 nach oben. Erstellt mit Microsoft™PowerPoint®.

II. Experimenteller Teil

Die Tablette wird zuerst mit der schmalen Seite (Steg) auf den S-Ausschnitt des XL-Add-ons aufgelegt. Dabei wird jeweils die Oberseite und die Unterseite des Stegs 3-fach vermessen. In den nachfolgenden Messungen werden die Tabletten, wie in Abbildung 8.2 gezeigt, auf die Schablone aufgelegt und beidseitig je 3-fach vermessen. Es wird eine Pinzette verwendet, um den Hautkontakt mit der Tablette zu vermeiden. Ansonsten könnte Hautfett übertragen werden, was zu verfälschten Spektren führt. Zusätzlich werden 3 Hintergrundmessungen durchgeführt, damit ausgeschlossen werden kann, dass die Schablone nicht vermessen wurde.

Messung des Pulvers

Die Tabletten werden, nachdem sie im Ganzen vermessen wurden, mittels Achatmörser gemörsert. Das entstandene Pulver jeder Tablette wird homogenisiert und in Glasvials gefüllt. Mit 16 Scans pro Messung werden nun die Proben im „Vial-Add-on“ analysiert. Es werden insgesamt drei Wiederholmessungen durchgeführt. Vor jeder Messung werden die Glasvials geschüttelt.

8.2.2 Versuchsdurchführung HPLC

In Anlehnung an das Ph. Eur. 6.0 wurde die Gehaltsbestimmung von Amoxicillin-Trihydrat mittels HPLC durchgeführt. Hierbei wird eine Säule mit einer Länge von 0,25m und einem Durchmesser von 4,6mm gefordert, die eine stationäre Phase aus octadecylsilyliertem Kieselgel zur Chromatographie *R* mit einer mittleren Teilchengröße von 5 µm enthält. Für die Versuchsdurchführung wurde die Säule entsprechend den Vorschriften des Arzneibuchs für zulässige Änderungen der in der Monographie vorgeschriebenen Methodenparametern (Kapitel 2.2.46 Eur. Arzneibuch) verändert. Die Säule wurde durch eine LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) LiChroCART® 125-4 ersetzt. Die Durchflussrate wurde mit 1ml/min nicht variiert, genauso wenig wie die Detektionswellenlänge von 254nm. Das Injektionsvolumen betrug 20µl.

Da die Durchflussrate nicht variiert wurde, musste die mobile Phase angepasst werden.

Für die mobile Phase wurde Pufferlösung pH 5 verwendet, die aus 2,72g KH₂PO₄ *R* in 1000ml H₂O hergestellt und mit 1molarer NaOH eingestellt wurde. Dann werden

II. Experimenteller Teil

480ml Puffer mit 20ml Acetonitril *R* gemischt. Durch die Erhöhung des Acetonitrilanteils wird die Retentionszeit des Amoxicillins verkürzt und liegt bei ca. 2,5 Minuten.

Die Proben werden nur mit Pufferlösung aufbereitet. Es ist eine Konzentration von 1mg/ml angestrebt. Das Pulver wird in geeignete Kolben genau gewogen und mit Puffer unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads gelöst und dann präzise bis zur Marke aufgefüllt.

Als Referenzlösung zur Kalibration werden 3 Lösungen in den Konzentrationen 0,5 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt (Tab. 8.1).

Zur Eignungsprüfung wird die Wiederholpräzision von 5 Messungen der Referenzlösung herangezogen. Als geeignet wird die gewählte Methode angesehen, wenn eine Wiederholpräzision vorliegt, bei der die relative Standardabweichung höchstens 1,0% beträgt. Anders als bei der im Arzneibuch vorgegebenen Methode wurde hier die Anzahl der Messungen zur Eignungsprüfung von 6 auf 5 Wiederholungsmessungen beschränkt.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt mittels Hitachi Merck HSM 7000 Software.

8.3 Auswertung und Ergebnisse

8.3.1 Rohdaten (Aussehen, Geruch, Masse)

Die oblongen Amoxicillin STADA® 1000mg Filmtabletten (Abb. 8.1) sind zu Beginn der Analyse von weißer Farbe. Ihre Breite beträgt laut Gelber Liste 8,2 mm, die Länge 22,3 mm und die durchschnittliche Masse ist mit 1254 mg angegeben. Sie riechen leicht nach Schwefel.

Während der Lagerung verändert sich die Farbe von weiß nach gelb und der Geruch nach Schwefel wird immer intensiver.

Tabelle 8.1 zeigt die Massen der Tabletten, die zu den spezifischen Auslagerungszeitpunkten ermittelt wurden.

II. Experimenteller Teil

Tab. 8.1: Masse der zu den vier Lagerzeitpunkten ausgeblisterten Probetabletten

	T0	T1	T3	T6
Tablette 1	1265,1 mg	1248,7 mg	1260,1 mg	1253,9 mg
Tablette 2	1251,9 mg	1284,1 mg	1273,7 mg	1259,6 mg
Tablette 3	1266,3 mg	1258,6 mg	1275,9 mg	1266,6 mg

Zum besseren Verständnis muss erwähnt werden, dass Tabletten, die einmal ausgelagert und vermessen wurden, nicht weiter gelagert werden können, da sie bei der Gehaltsbestimmung zerstört werden.

8.3.2 Rohdaten NIR

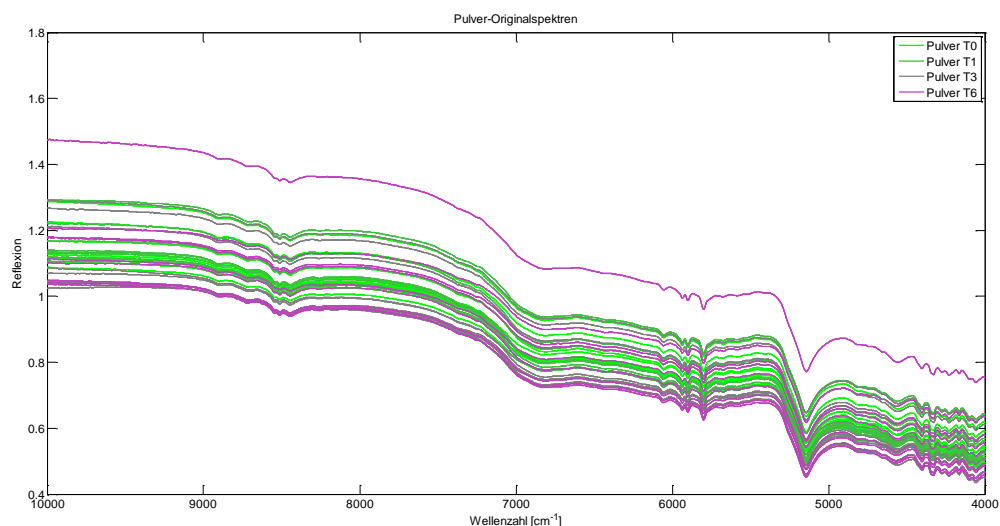


Abb. 8.3: Originalspektren der Pulver, die an den vier jeweiligen Entnahmezeitpunkten vermessen wurden.

Die verschiedenartigen Oberflächen der Tablettenseiten und die unterschiedlichen Positionierungen auf dem Messinstrument führen zu schwankenden Intensitäten. Abb. 8.4 zeigt dies durch einen Bruch auf circa ein Drittel des Spektrenblocks. Daher wurden die Daten nochmals (Abb. 8.5 und 8.6) so dargestellt, dass der Verlauf der durch die unterschiedliche Positionierung erzeugt wird, besser zu verfolgen ist. Man kann erkennen, dass die Streuung geringer ist, wenn die Proben auf der flachen Seite vermessen werden.

II. Experimenteller Teil

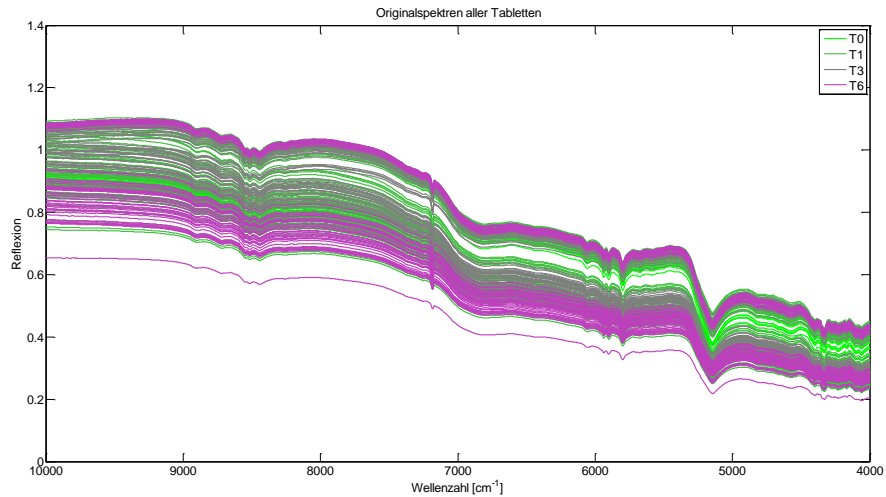


Abb. 8.4: Originaldaten der Tablettenspektren. Die vier verschiedenen Entnahmezeitpunkte werden farblich getrennt dargestellt.

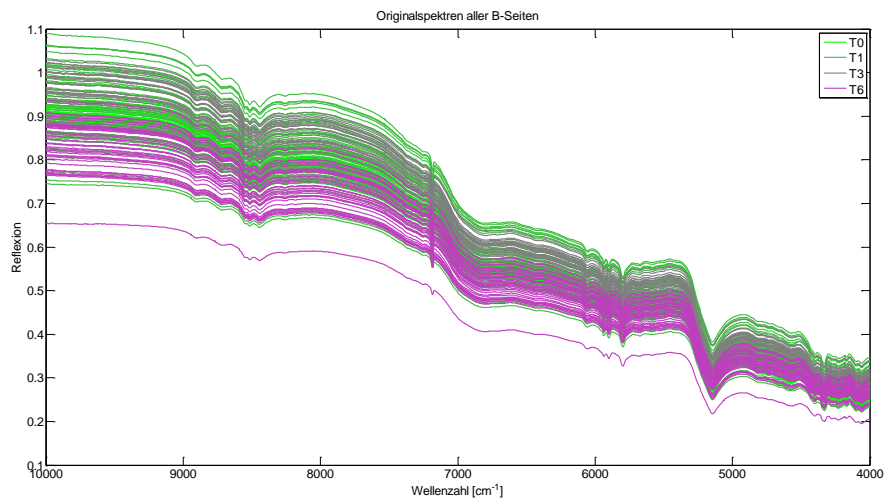


Abb. 8.5: Originaldaten aller Spektren, die auf den Seiten B1 und BA vermessen wurden. Für diese Datenmasse wird die Sammelbezeichnung B eingeführt. Der Entnahmezeitpunkt wird farblich unterschieden.

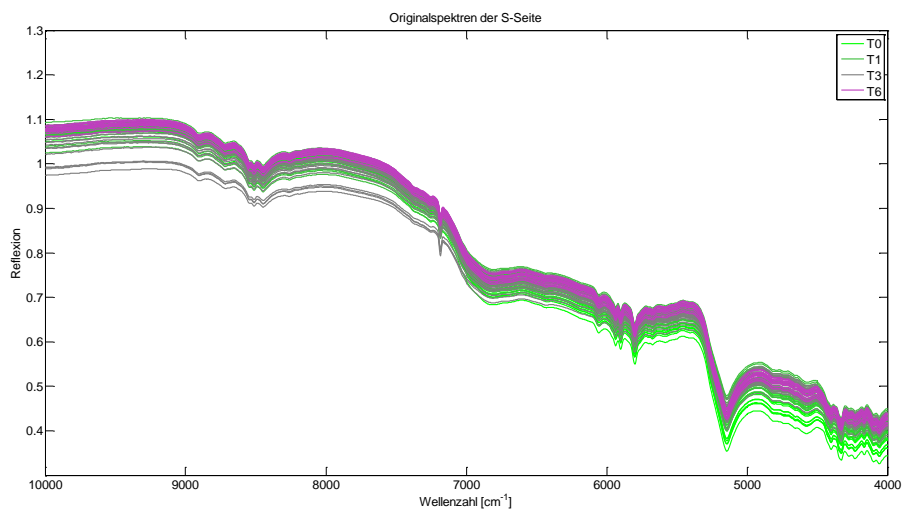


Abb. 8.6: Originaldaten aller Spektren, die durch das Vermessen der Tablette auf der flachen Seite „S“ erzeugt wurden. Der Entnahmezeitpunkt wird farblich unterschieden.

8.3.3 HPLC-Kalibration

In Tabelle 8.2 wird die Standardabweichung über Gl. 8.1 berechnet. Die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ gibt an, wie weit ein Wert einer Stichprobe um den Mittelwert streut.

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{(n-1)}} \quad (\text{Gl. 8.1})$$

y: Probe

\bar{y} : Mittelwert der Stichprobe

n: Stichprobenumfang

Die Relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) wird über Standardabweichung $\hat{\sigma}$ und Mittelwert der Stichprobe \bar{y} nach Gl. 8.2 berechnet:

$$v = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{y}} \quad (\text{Gl. 8.2})$$

Tab. 8.2: Referenzlösungen zur Kalibration für die Auswertung der Daten von T0 bis T3.

	Konz. [g/100ml]	Peakfläche	Standard- Abweichung ($\hat{\sigma}$)	Rel. Standard- Abweichung
STD 1_1	0,04978	587599	3188,5	0,54%
STD 1_2	0,04978	585067		
STD 1_3	0,04978	592657		
STD 1_4	0,04978	584720		
STD 1_5	0,04978	588231		
STD 2_1	0,08134	938438	8617,7	0,90%
STD 2_2	0,08134	954351		
STD 2_3	0,08134	958429		
STD 2_4	0,08134	960331		
STD 2_5	0,08134	952759		
STD 3_1	0,12174	1423221	8307,8	0,59%
STD 3_2	0,12174	1416032		
STD 3_3	0,12174	1405896		
STD 3_4	0,12174	1405807		
STD 3_5	0,12174	1404044		

II. Experimenteller Teil

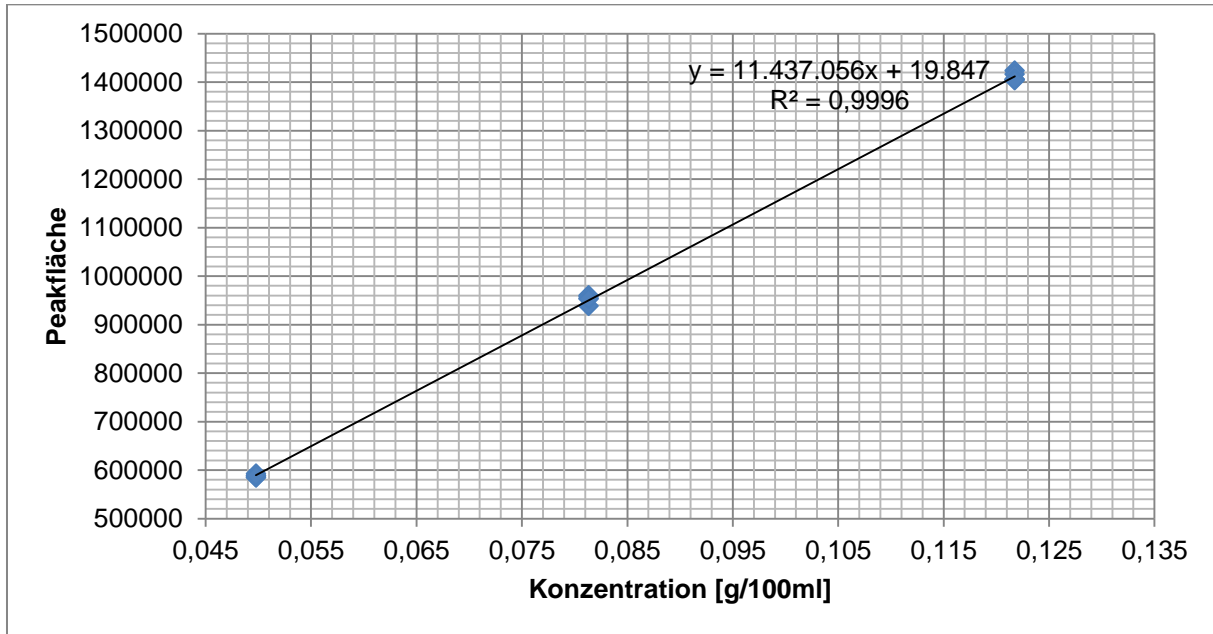


Abb. 8.7: HPLC-Kalibriergerade von Amoxicillin-Trihydrat. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration. Die Daten wurden Tabelle 8.2 entnommen.

Tabelle 8.2 zeigt die mittels Software nachintegrierten Peakflächen und daraus errechneten Standardabweichungen der Referenzlösungen zur Kalibration, welche für die Auswertung der 0, 1 und 3-Monatsdaten genutzt wurde.

Die Probenaufbereitung der zu den Zeitpunkten 0 und 1 ausgelagerten Proben fand erst gemeinsam mit den in Monat 3 ausgelagerten Proben statt. Für die letzte Auslagerung wurde eine weitere Aufarbeitung mit einer neuen Kalibrationsreihe in Monat 6 durchgeführt.

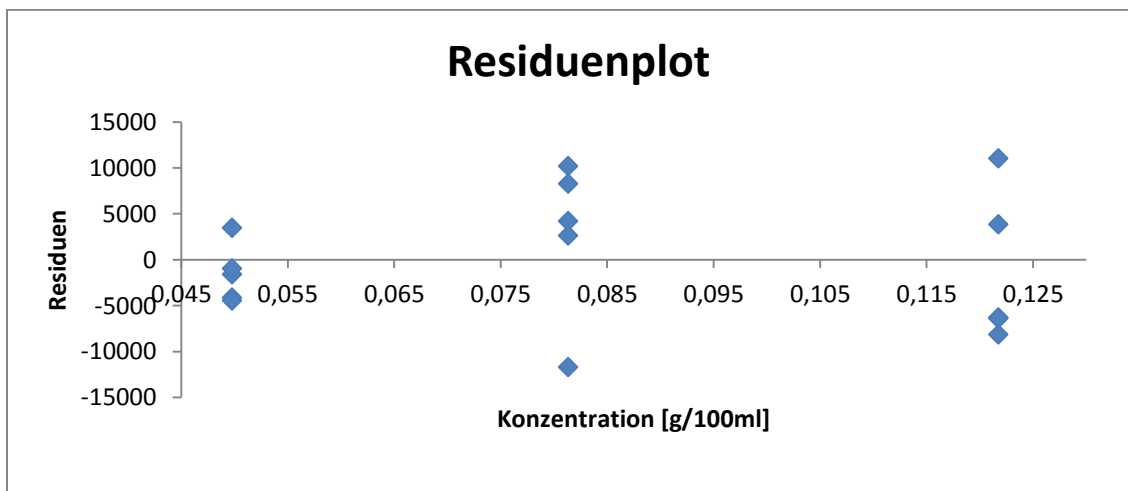


Abb. 8.8: Residuenplot auf Basis der Kalibrierfunktion aus Abb. 8.7 und der Daten aus Tabelle 8.2.

II. Experimenteller Teil

Tab. 8.3: Referenzlösungen zur Kalibration für die Auswertung der Daten von T6.

	Konz. [g/100ml]	Peakfläche	Standard- Abweichung (σ)	Rel. Standard- Abweichung
STD 1_1	0,05016	587583	3573,6	0,61%
STD 1_2	0,05016	585129		
STD 1_3	0,05016	582960		
STD 1_4	0,05016	591226		
STD 1_5	0,05016	582637		
STD 2_1	0,08026	938438	4734,6	0,51%
STD 2_2	0,08026	929738		
STD 2_3	0,08026	930141		
STD 2_4	0,08026	927046		
STD 2_5	0,08026	935929		
STD 3_1	0,12009	1368273	9748,9	0,71%
STD 3_2	0,12009	1387001		
STD 3_3	0,12009	1375098		
STD 3_4	0,12009	1360532		
STD 3_5	0,12009	1371054		

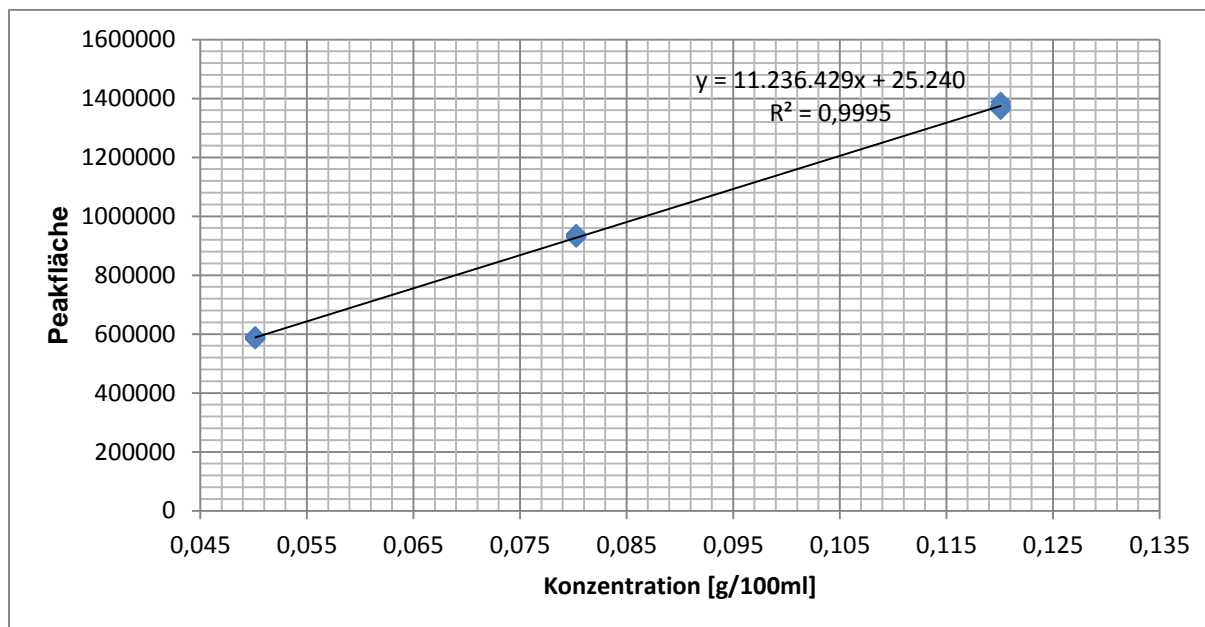


Abb. 8.9: HPLC-Kalibriergerade von Amoxicillin-Trihydrat. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration. Die Daten wurden Tabelle 8.3 entnommen.

II. Experimenteller Teil

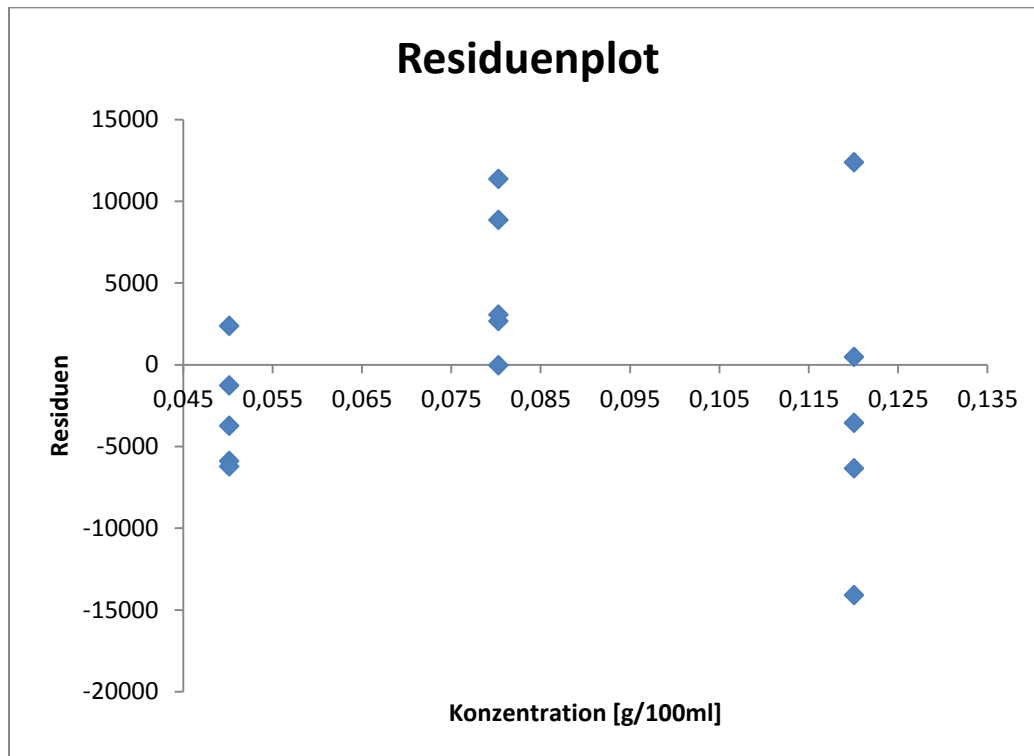


Abb. 8.10: Residuenplot auf Basis der Kalibrierfunktion aus Abb. 8.9 und der Daten aus Tabelle 8.3.

Die relative Standardabweichung aus 5 Injektionen einer Referenzkonzentration beträgt immer $\leq 1,0\%$, wie es in der Arzneibuchmonographie für die Eignungsprüfung gefordert wird.

8.3.4 HPLC-Proben

Für die Auswertung der Gehaltsbestimmungen in den folgenden Tabellen wurden nachstehende Berechnungen durchgeführt:

Der Massenkonzentration an Amoxicillin [g/100ml] wird durch Verwendung der Regressionsgerade unter Einbeziehen der Einwaage und der resultierenden Peakfläche erhalten.

Teilt man nun die Masse Amoxicillin durch die Einwaage, ergibt sich der ermittelte Massenanteil.

Den theoretischen Massenanteil erhält man beim Teilen der Arzneistoffmasse (1000 mg Amoxicillin, eingesetzt als Trihydrat) durch die Tablettenmasse (Tab. 8.1).

Der Quotient aus dem ermittelten und dem theoretischen Massenanteil ergibt die Wiederfindungsrate.

II. Experimenteller Teil

Tab. 8.4: Gehaltsbestimmung von Amoxicillin in den Tablettenproben von Zeitpunkt „T0“

T0	Einwaage [g/100ml]	Peakfläche	Amoxicillin [g/100ml]	Gehalt (ermittelt) [%]	Gehalt (theoretisch) [%]	Wieder- findungsrate [%]
Tabl 1_1	0,10062	1055410	0,0905	89,99	90,74	99,17
Tabl 1_2	0,09961	1054334	0,0905	90,80	90,74	100,07
Tabl 1_3	0,10105	1067085	0,0916	90,61	90,74	99,86
Mittelwert				90,47		99,70
Tabl 2_1	0,09996	1051333	0,0902	90,22	91,70	98,39
Tabl 2_2	0,10076	1061106	0,0910	90,36	91,70	98,53
Tabl 2_3	0,09974	1046998	0,0898	90,04	91,70	98,19
Mittelwert				90,21		98,37
Tabl 3_1	0,10090	1060797	0,0910	90,20	90,66	99,50
Tabl 3_2	0,10000	1018225	0,0873	87,29	90,66	96,29
Tabl 3_3	0,99680	1038788	0,0891	89,38	90,66	98,59
Mittelwert				88,96		98,13

Tab. 8.5: Gehaltsbestimmung von Amoxicillin in den Tablettenproben von Zeitpunkt „T1“

T1	Einwaage [g/100ml]	Peakfläche	Gehalt [g/100ml]	Gehalt (ermittelt) [%]	Gehalt (theoretisch) [%]	Wieder- findungsrate [%]
Tabl 1_1	0,10062	1039241	0,0891	88,81	91,94	96,60
Tabl 1_2	0,09961	1056716	0,0907	90,44	91,94	98,37
Tabl 1_3	0,10105	1053594	0,0904	90,24	91,94	98,16
Mittelwert				89,83		97,71
Tabl 2_1	0,10090	1060427	0,0910	90,17	89,40	100,86
Tabl 2_2	0,09992	1039081	0,0891	89,19	89,40	99,76
Tabl 2_3	0,09966	1041863	0,0894	89,66	89,40	100,30
Mittelwert				89,67		100,31
Tabl 3_1	0,10032	1042949	0,0895	89,17	91,21	97,76
Tabl 3_2	0,10132	1054589	0,0905	89,29	91,21	97,90
Tabl 3_3	0,09910	1029896	0,0883	89,12	91,21	97,70
Mittelwert				89,19		97,79

II. Experimenteller Teil

Tab. 8.6: Gehaltsbestimmung von Amoxicillin in den Tablettenproben von Zeitpunkt „T3“

T3	Einwaage [g/100ml]	Peakfläche	Gehalt [g/100ml]	Gehalt (ermittelt) [%]	Gehalt (theoretisch) [%]	Wieder- findungsrate [%]
Tabl 1_1	0,10098	1044130	0,0896	88,69	91,10	97,35
Tabl 1_2	0,10054	1029869	0,0883	87,84	91,10	96,42
Tabl 1_3	0,09966	1028782	0,0882	88,52	91,10	97,16
Mittelwert				88,35		96,98
Tabl 2_1	0,09954	1022711	0,0877	88,09	90,13	97,74
Tabl 2_2	0,10002	1026293	0,0880	87,98	90,13	97,61
Tabl 2_3	0,09978	1013127	0,0868	87,04	90,13	96,57
Mittelwert				87,70		97,31
Tabl 3_1	0,10052	1018374	0,0873	86,85	89,98	96,53
Tabl 3_2	0,10048	1016959	0,0872	86,77	89,98	96,43
Tabl 3_3	0,09994	1029737	0,0883	88,35	89,98	98,20
Mittelwert				87,32		97,05

Tab. 8.7: Gehaltsbestimmung von Amoxicillin in den Tablettenproben von Zeitpunkt „T6“

T6	Einwaage [g/100ml]	Peakfläche	Gehalt [g/100ml]	Gehalt (ermittelt) [%]	Gehalt (theoretisch) [%]	Wieder- findungsrate [%]
Tabl 1_1	0,09996	1006491	0,0873	87,29	91,55	95,35
Tabl 1_2	0,10051	1006275	0,0872	86,80	91,55	94,81
Tabl 1_3	0,10122	1055759	0,0916	90,53	91,55	98,88
Mittelwert				88,21		96,35
Tabl 2_1	0,10090	1018530	0,0883	87,54	91,14	96,05
Tabl 2_2	0,10007	1005653	0,0872	87,12	91,14	95,59
Tabl 2_3	0,10040	991543	0,0859	85,59	91,14	93,91
Mittelwert				86,75		95,19
Tabl 3_1	0,10082	1003822	0,0870	86,31	90,64	95,23
Tabl 3_2	0,09992	987512	0,0856	85,64	90,64	94,49
Tabl 3_3	0,10052	996503	0,0864	85,93	90,64	94,80
Mittelwert				85,96		94,84

II. Experimenteller Teil

Wie erwartet lässt sich der Abfall der Konzentration von Amoxicillin-Trihydrat in den gelagerten Tabletten in den Tabellen 8.4 bis 8.7 erkennen. Nach einer sechsmonatigen Lagerung unter den oben genannten Stresstest-Bedingungen, die für die Zulassung Hinweise auf den Verlauf der Produktstabilität liefern, konnte ein Abbau des Wirkstoffs von ca. 5% beobachtet werden. Im weiteren Verlauf soll gezeigt werden, dass ein geeignetes NIR-Kalibrationsmodell auf der Basis dieser Gehaltsbestimmungen erstellt werden und zur Identifizierung von Amoxicillin STADA Tabletten unbekannten Alters genutzt werden kann.

8.3.5 NIR-Auswertung

Die in Kapitel 8.3.2. dargestellten Originalspektren des Pulvers werden in Matlab 7.0 importiert und als solche verwendet.

Da die Tabletten zur Positionierung auf einer Papierschablone vermessen wurden, muss von den Tablettenspektren der Mittelwert der durchgeführten Hintergrundmessungen abgezogen werden. Erst dann kann eine weitere Datenvorbehandlung erfolgen.

Um die Unterschiede zwischen den Spektren der verschiedenen Lagerzeitpunkte deutlicher herausarbeiten zu können, wurden verschiedene Methoden zur Datenvorbehandlung (siehe Kap. 4.1.) miteinander verglichen und eine Vorauswahl getroffen.

Durch die gezielte Kombination aus Standardisierung und Savitzky-Golay-Ableitung erhält man die beste Aufteilung der einzelnen Lagerzeitpunkte in separierte Datenwolken, sogenannte Cluster. Dabei werden die erste und die zweite Ableitung jeweils über 15 Datenpunkten und das Polynom 3. Ordnung betrachtet. Abschließend wird auf Basis der vorbehandelten Spektren jeweils eine Hauptkomponentenanalyse (siehe 4.2) durchgeführt.

Die ausgewählte Kombination der Datenvorbehandlung wird zuerst auf die Pulverspektren der Tabletten angewendet. Abbildung 8.11 zeigt, dass diese Spektren sich nicht für eine Modellerstellung eignen, da keine separierten Datenwolken gebildet werden können. Auch mit mehr Dimensionen konnte keine vollständige Aufspaltung erzielt werden.

Als nächstes werden die sogenannten B-Spektren für die Berechnung verwendet. Hierbei handelt es sich um der Kombination aller BA- und B1-Spektren, die in der

II. Experimenteller Teil

Bezeichnung B zusammengefasst werden. Auch bei diesen Spektren wird vor der Datenvorbehandlung zuerst ein Mittelwertspektrum für jede Tablette erstellt. Da die Positionierung der Tablette einen starken Einfluss auf das resultierende Spektrum hat, spaltet sich jeder Cluster in zwei Untercluster auf. Wenn alle B-Spektren einer Tablette ohne Bildung eines Tablettenmittelwertes für die Berechnung verwendet werden (siehe Abb. 8.14).

Weiterhin soll versucht werden die Probengruppe so auszuwählen, dass möglichst für jeden Auslagerungszeitpunkt in der Hauptkomponentenanalyse nur eine einzige Punktwolke resultiert. Daher wurde die oben beschriebene Berechnung sowohl mit den Spektren der auf der Seite vermessenen Tablette (siehe Abb. 8.11) als auch mit BA-Spektren (siehe Abb. 8.13) und B1-Spektren (siehe Abb. 8.12) bezeichneten Spektren durchgeführt.

Die beste Clusterbildung, also die fast vollständige Trennung der vier Lagerzeitpunkte, erzielt man mit den B-Spektren. Hier werden die Methoden der Standardisierung und die zweite Ableitung nach Savitzky und Golay nacheinander auf den Datensatz, der aus 144 Spektren besteht, angewendet. Anschließend wird mit diesen vorbehandelten Spektren eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Hierbei erklären die ersten beiden Hauptkomponenten 81,16% der gesamten Varianz, die sich zu 69,93% auf Hauptkomponente 1 und zu 11,24% auf Hauptkomponente 2 verteilen.

II. Experimenteller Teil

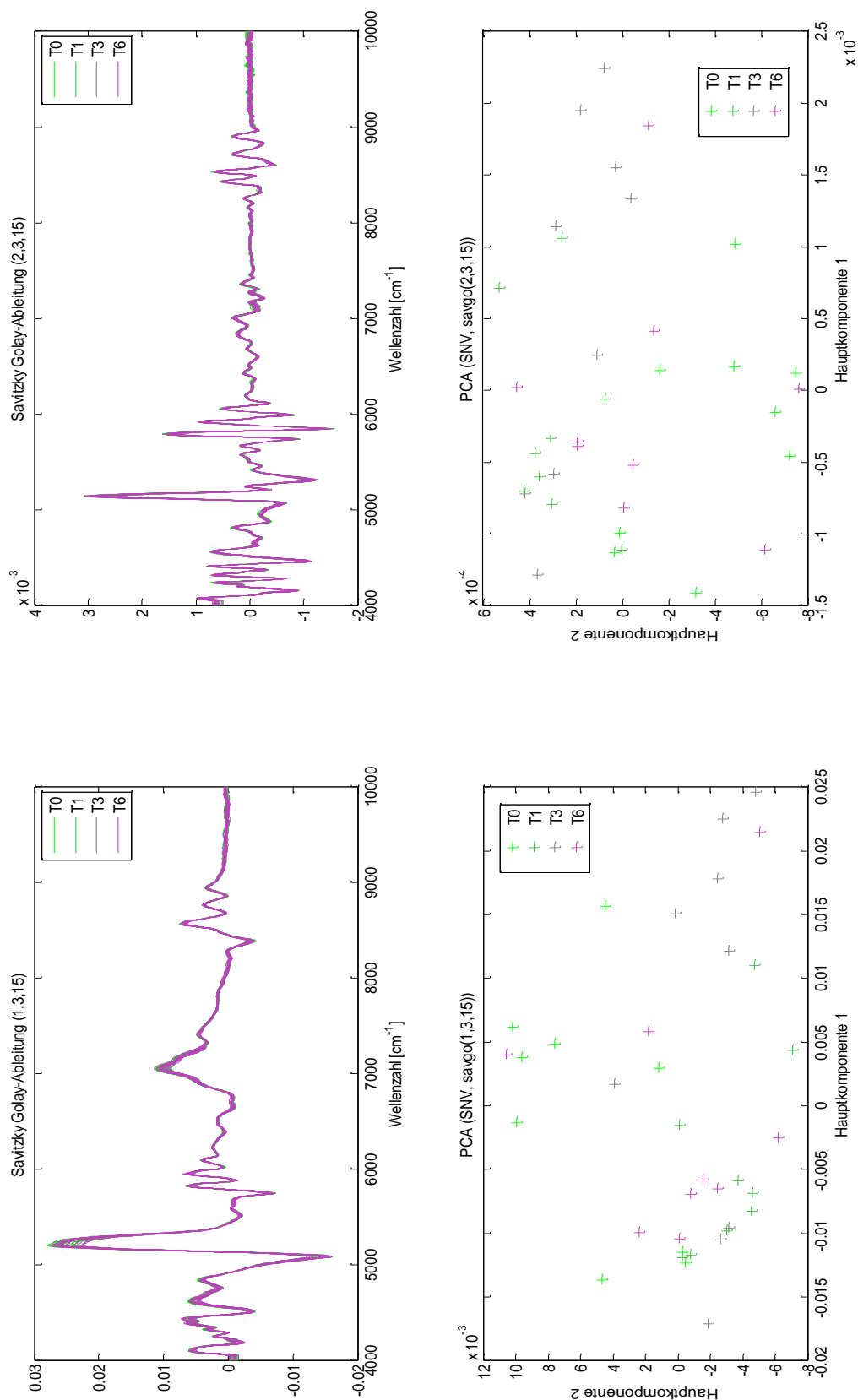


Abb. 8.10: Vergleich einer Kombination von zwei verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden der Pulverspektren. Oben: Zuerst werden die Spektren einer Standardisierung (Kap. 4.1.3.2) und dann der 2. Ableitung nach Savitzky-Golay unterzogen. Die ersten beiden Hauptkomponenten der PCA werden zur Überprüfung der Gruppenbildung graphisch dargestellt. Unten: wird die Datenvorbehandlung in SNV und 1. Savitzky-Golay-Ableitung verändert und ebenfalls eine PCA zur Überprüfung der Gruppenbildung durchgeführt.

II. Experimenteller Teil

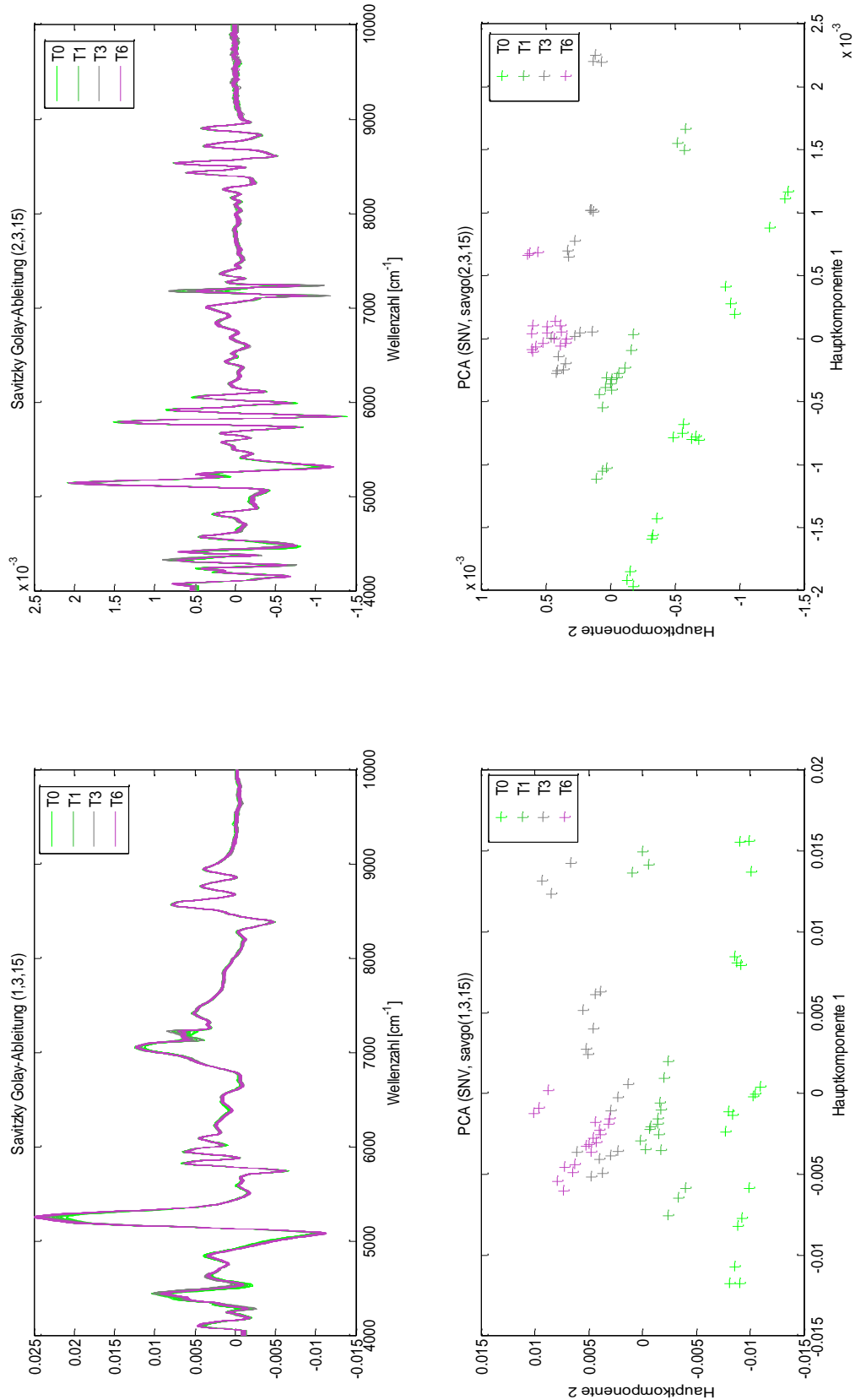


Abb. 8.11: Vergleich einer Kombination von zwei verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden der S-Spektren. Oben: Zuerst werden die Spektren einer Standardisierung (Kap. 4.1.3.2) und dann der 2. Ableitung nach Savitzky-Golay unterzogen. Die ersten beiden Hauptkomponenten der PCA werden zur Überprüfung der Gruppenbildung graphisch dargestellt. Unten wird die Datenvorbehandlung in SNV und 1. Savitzky-Golay-Ableitung verändert und ebenfalls eine PCA zur Überprüfung der Gruppenbildung durchgeführt.

II. Experimenteller Teil

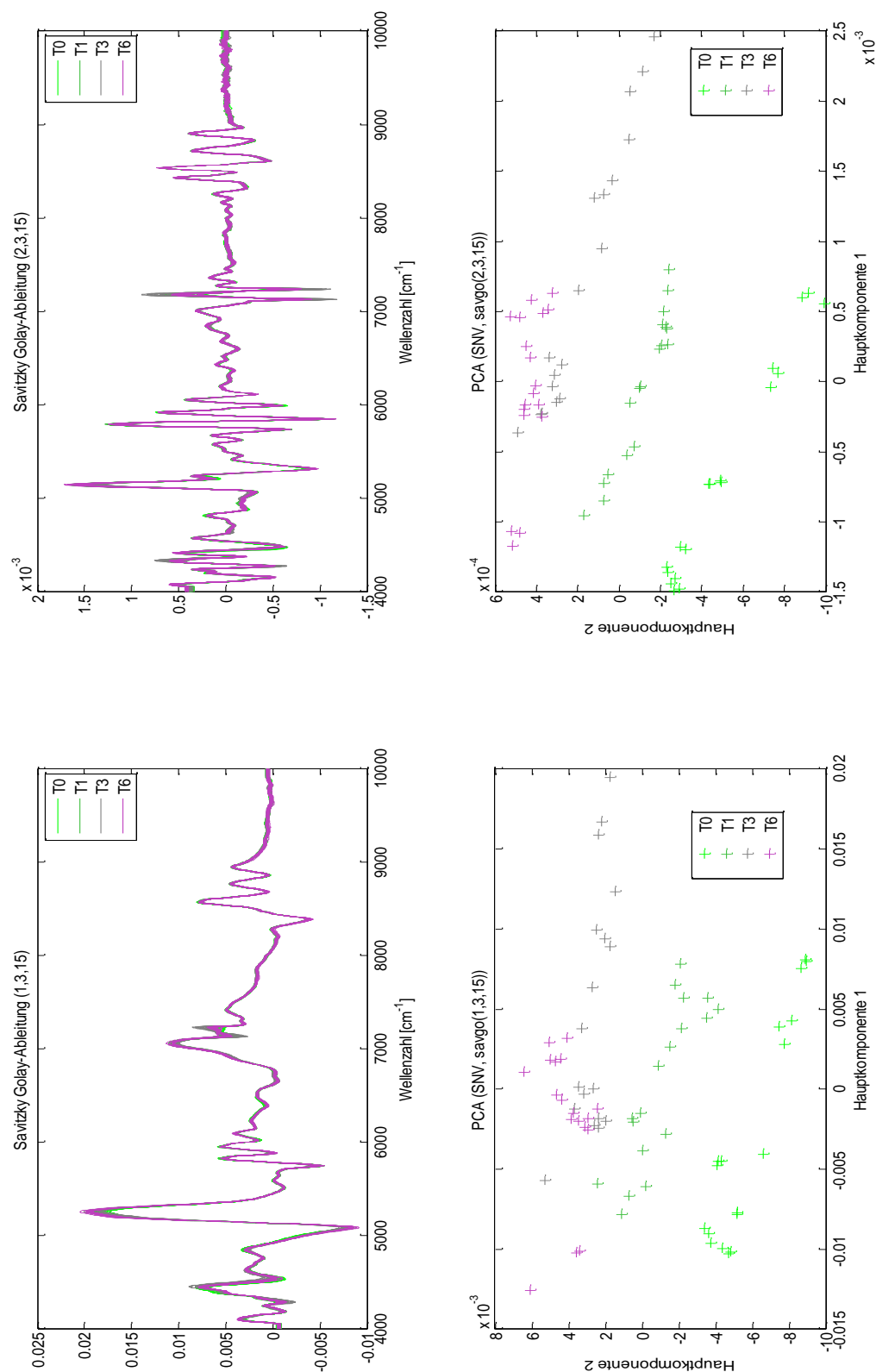


Abb. 8.12: Vergleich einer Kombination von zwei verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden der B1-Spektren. Oben: Zuerst werden die Spektren einer Standardisierung (Kap. 4.1.3.2) und dann der 2. Ableitung nach Savitzky-Golay unterzogen. Die ersten beiden Hauptkomponenten der PCA werden zur Überprüfung der Gruppenbildung graphisch dargestellt. Unten wird die Datenvorbehandlung in SNV und 1. Savitzky-Golay-Ableitung verändert und ebenfalls eine PCA zur Überprüfung der Gruppenbildung durchgeführt.

II. Experimenteller Teil

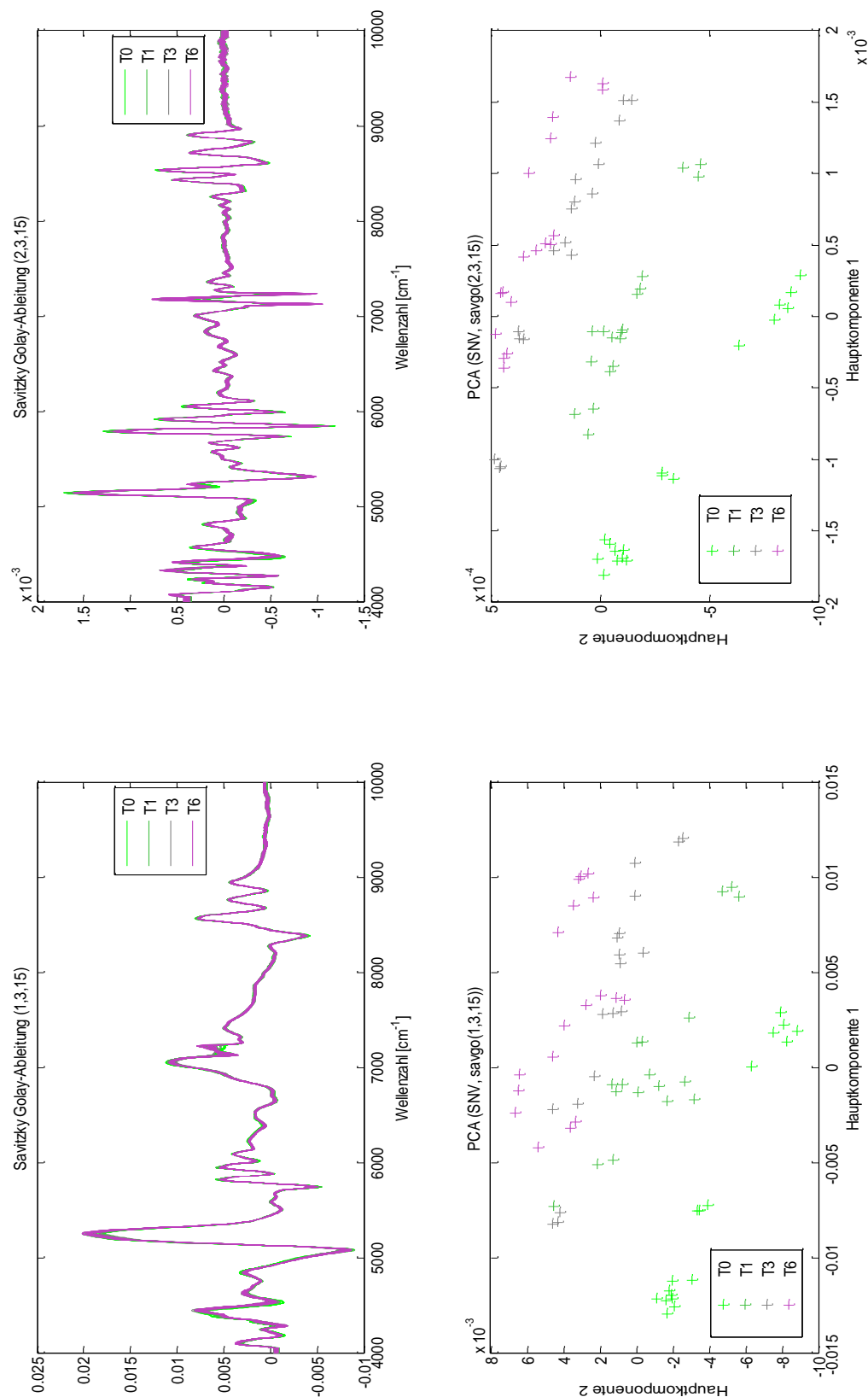


Abb. 8.13: Vergleich einer Kombination von zwei verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden der BA-Spektren. Oben: Zuerst werden die Spektren einer Standardisierung (Kap. 4.1.3.2) und dann der 2. Ableitung nach Savitzky-Golay unterzogen. Die ersten beiden Hauptkomponenten der PCA werden zur Überprüfung der Gruppenbildung graphisch dargestellt. Unten wird die Datenvorbehandlung in SNV und 1. Savitzky-Golay-Ableitung verändert und ebenfalls eine PCA zur Überprüfung der Gruppenbildung durchgeführt.

II. Experimenteller Teil

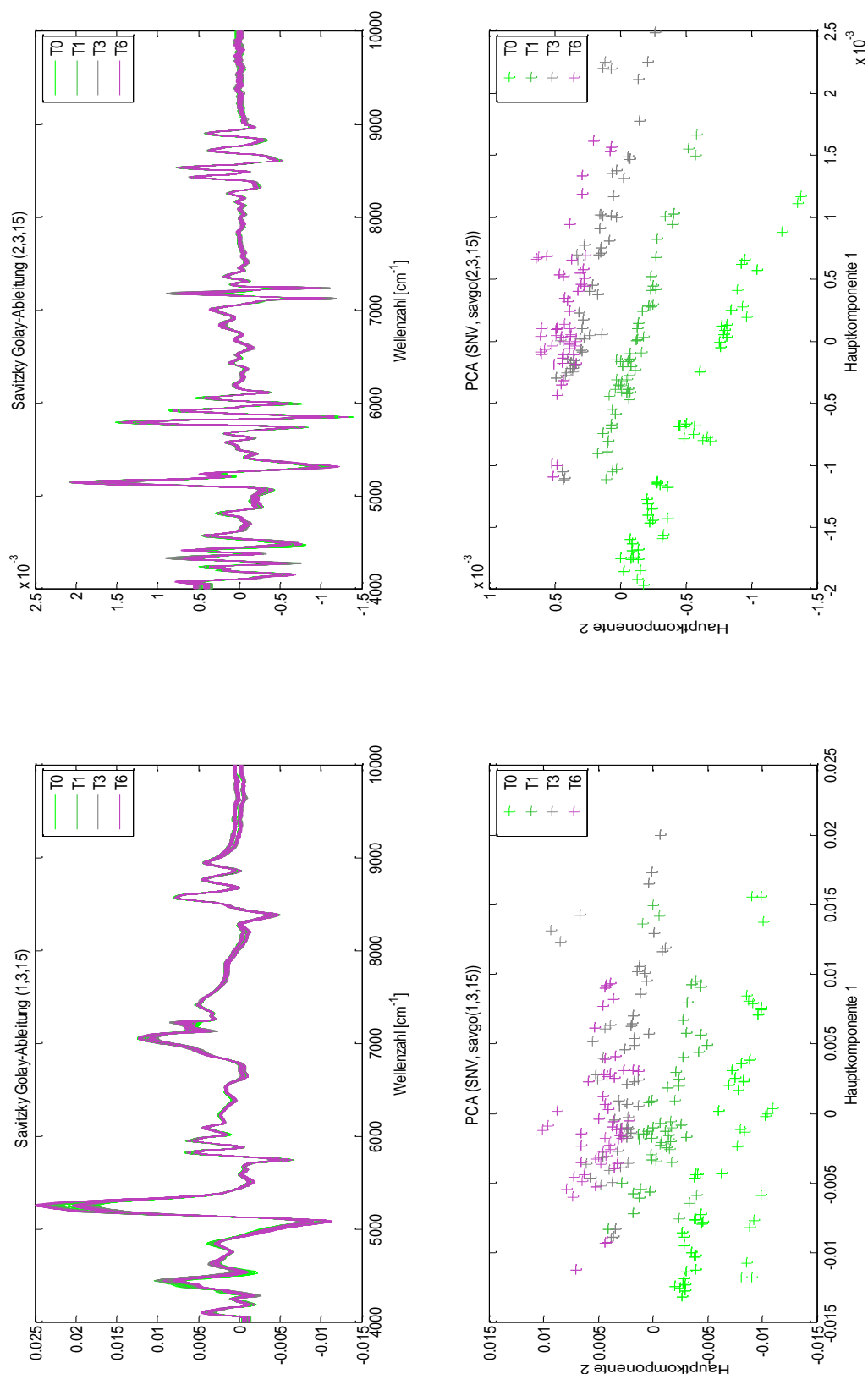


Abb. 8.14: Vergleich einer Kombination von zwei verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden aller B-Spektren. Oben: Zuerst werden die Spektren einer Standardisierung (Kap. 4.1.3.2) und dann der 2. Ableitung nach Savitzky-Golay unterzogen. Die ersten beiden Hauptkomponenten der PCA werden zur Überprüfung der Gruppenbildung graphisch dargestellt. Unten wird die Datenvorbehandlung in SNV und 1. Savitzky-Golay-Ableitung verändert und ebenfalls eine PCA zur Überprüfung der Gruppenbildung durchgeführt.

II. Experimenteller Teil

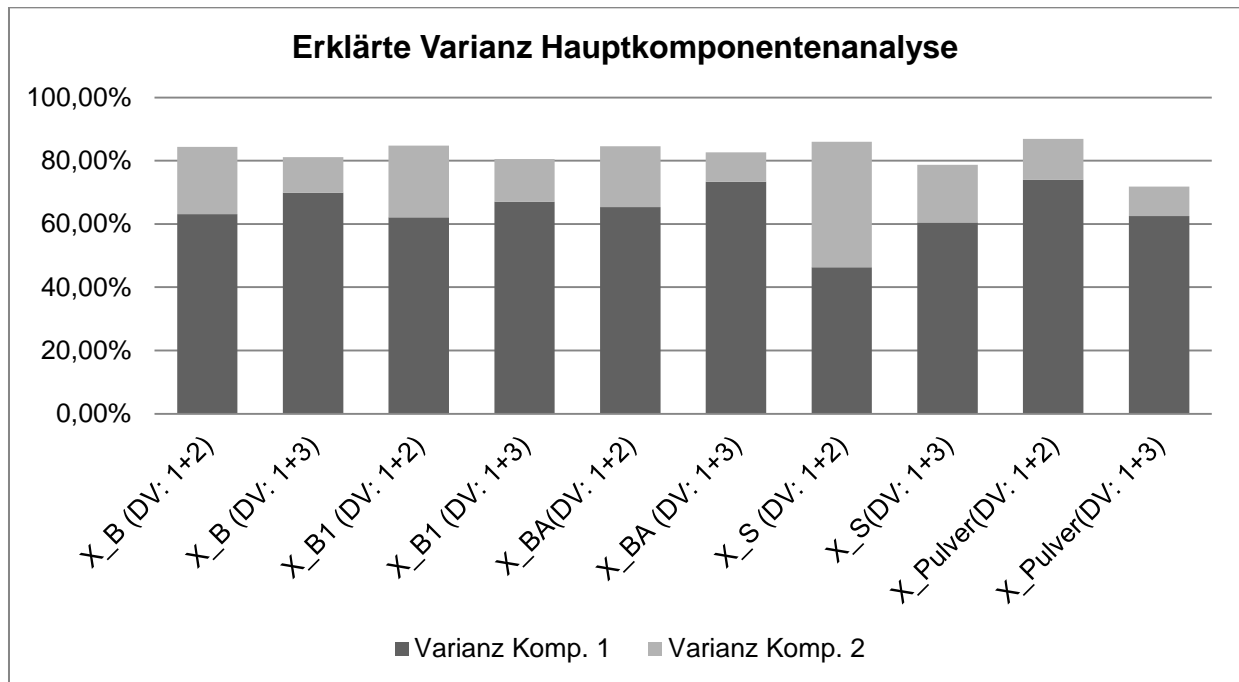


Abb. 8.15: Erklärte Varianz durch die ersten zwei Hauptkomponenten nach kombinierter Datenvorbehandlung.

DV: Datenvorbehandlung

1: Streulichtkorrektur SNV

2: Erste Ableitung nach Savitzky-Golay über 3. Polynom u. 15. Datenpunkte

3: Zweite Ableitung nach Savitzky-Golay über 3. Polynom u. 15. Datenpunkte

Abbildung 8.15 verdeutlicht, dass die erklärte Gesamtvarianz der ersten beiden Komponenten nicht stark variiert. Mit Hilfe der ersten zwei Hauptkomponenten können zwischen 70% und 86% der Gesamtvarianz erklärt werden. Allerdings ermöglicht die Hauptkomponentenanalyse lediglich einen ersten Überblick über den Datensatz. Das Ziel dieses Projekts ist es, die vier Auslagerungszeitpunkte in vier separate Punktwolken im Raum zu sortieren und unbekannte Proben aufgrund ihres NIR-Spektrums nach geeigneter Datenvorbehandlung entsprechend ihres Alters einzuordnen. Wie man in Abb. 8.14 sehen kann, überlagern sich die Auslagerungszeiträume T3 und T6. Die Anwendung einer kreuzvalidierten Linearen Diskriminanzanalyse (LDA) (siehe Kap. 4.4) ermöglicht zwar auch in diesem Fall eine Vorhersage, diese ist jedoch mit einem Fehler behaftet, der vom Überlagerungsgrad abhängig ist. Da für das Modell keine unbekannten Proben zur Verfügung stehen, müssen diese selbst generiert werden. Dies erfolgt mittels der in Kap. 4.5. vorgestellten Validierungstechnik bei der jeweils ein Spektrum aus der Modellbildung herausgelassen und für die Vorhersage verwendet wird (engl. Leave One Out Cross

II. Experimenteller Teil

Validation; Abk.: LOO-CV). Es werden wieder alle vorhandenen Spektren mit verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden auf ihre Eignung untersucht.

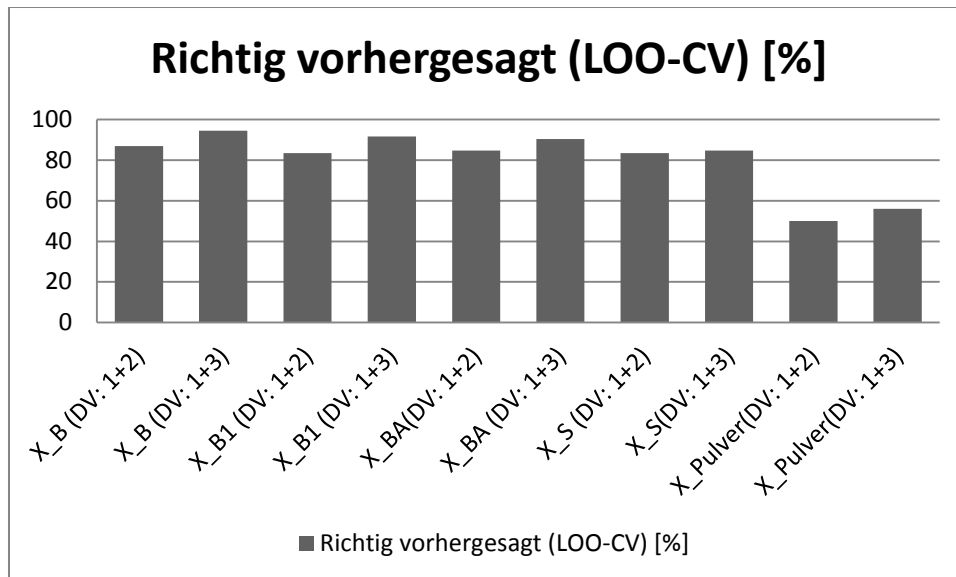


Abb. 8.16: Überblick über die richtig Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit, bestimmt mittels LOO-CV LDA auf allen 10 Datensätzen in Prozent.

DV: Datenvorbehandlung

1: Streulichtkorrektur

2: Erste Ableitung nach Savitzky-Golay über 3. Polynom u. 15. Datenpunkte

3: Zweite Ableitung nach Savitzky-Golay über 3. Polynom u. 15. Datenpunkte

Hierbei zeigt sich das beste Vorhersageergebnis auf dem Datensatz X_B mit der Kombination aus Standardisierung und zweiter Ableitung nach Savitzky und Golay über das 3. Polynom und 15. Datenpunkten (siehe Abb. 8.16). Von den 144 Spektren werden nur 7 Spektren in den falschen Cluster eingruppiert (siehe Tab. 8.8).

Tab. 8.8: Zuordnung der Auslagerungsdaten des Datensatz X_B nach LOO-CV LDA in den jeweiligen Datenclustern.

	T0	T1	T3	T6
T0	36	0	0	0
T1	0	36	0	0
T3	0	0	35	1
T6	0	0	6	30

Die Kombination eines geeigneten Datensatzes, verschiedener Datenvorbehandlungsmethoden und der LDA ermöglicht die eindeutige Zuordnung

II. Experimenteller Teil

unbekannter Proben in die beiden Auslagerungszeitpunkte T0 und T1 (siehe Tab. 8.8). Die Spektren der Auslagerungspunkte T3 und T6 unterscheiden sich zueinander nicht so stark wie zu anderen Zeitpunkten. Hier werden einige falsche Zuordnungen getroffen, die in Abb. 8.17 gekreuzt dargestellt werden.

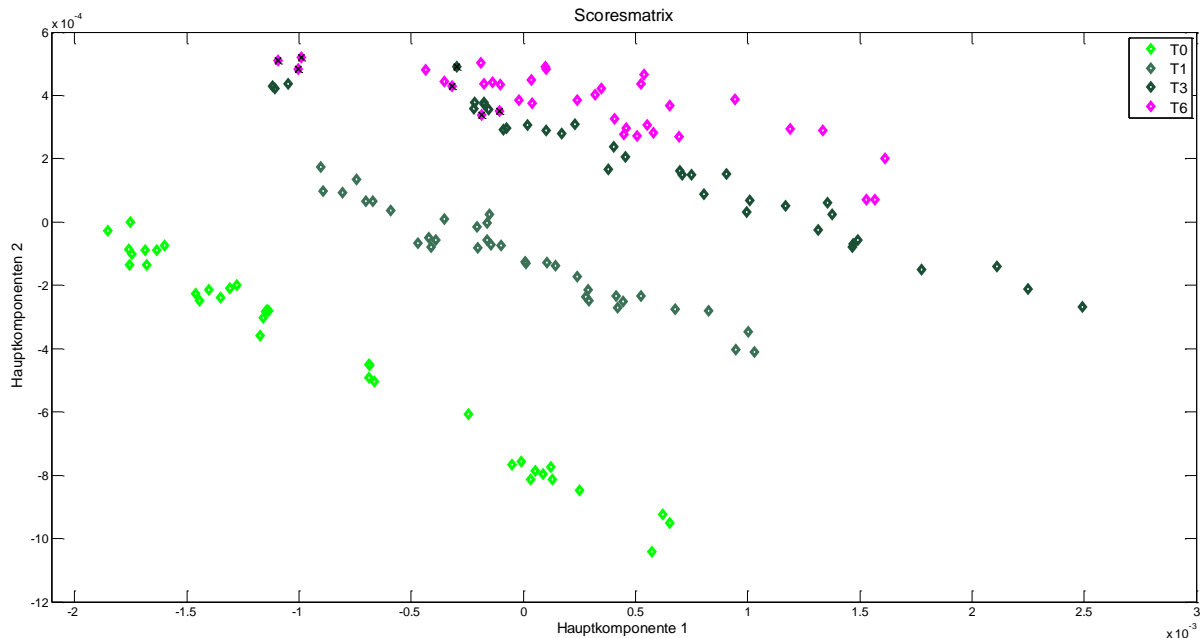


Abb. 8.17: Visualisierung der Zuordnung der Auslagerungsdaten des Datensatz X_B nach LOO -kreuzvalidierter LDA in den jeweiligen Datenclustern. Die durchkreuzten Datenpunkte wurden falsch zugeordnet.

8.3.6 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Alterung von Tabletten mittels NIR dokumentiert werden kann. Dazu müssen allerdings die Unterschiede in der Datenstruktur groß genug sein, damit sich klar voneinander getrennte Cluster bilden können. Nur dann kann mit Hilfe einer geeigneten Datenvorbehandlung auf einem ausgewählten Datensatz ein LDA-Modell erstellt werden, welches eine Vorhersage des Zersetzungsgrades und somit des Alters der Tabletten erlaubt. Überlagern sich die einzelnen Datenwolken, wird die Vorhersage unbekannter Proben verfälscht. Dabei gilt: Je größer die Überlagerung, desto größer auch der Vorhersagefehler. In solchen Fällen muss sowohl die Datenvorbehandlung als auch die Auswertmethode an das jeweils vorliegende Problem angepasst werden. Dies ist ein sehr aufwendiger Prozess welcher als zeitbestimmender Schritt den Flaschenhals der NIR-Analytik bildet.

II. Experimenteller Teil

In diesem Kapitel konnte ohne eine Vorhersage des Gehaltes das Alter der Proben bestimmt werden. Für die Industrie ist eine solche Vorhersage nicht als Stabilitätskontrolle ausreichend. Hierzu müsste auch ein Kalibrationsmodell für die Gehaltsbestimmung erarbeitet werden.

Obwohl die NIR im Bereich der Probenvorbereitung einen entscheidenden zeitlichen Vorteil bietet, wird dieser jedoch bei der notwendigen Erstellung eines Kalibrationsmodells wieder nivelliert. An dieser Stelle darf nicht unerwähnt bleiben, dass ein Kalibrationsmodell von vielen Parametern bei der Tablettenherstellung abhängig ist. Insbesondere variieren der Pressdruck und die exakte Zusammensetzung leicht von Charge zu Charge. Dies erfordert eine fortwährende Anpassung des Modells.

Im nachfolgenden Kapitel wird deshalb versucht die Erstellung eines Kalibrationsmodells zu vereinfachen. Eine Empfehlung zum Ersatz der HPLC durch die NIR bei der Stabilitätskontrolle kann aus den oben genannten Gründen nicht ausgesprochen werden.

9. Klassifikation von Chargen

Wie bereits in den theoretischen Grundlagen beschrieben wurde, handelt es sich bei der NIR-Spektrometrie um eine, im Gegensatz zu den etablierten chromatographischen Methoden, zerstörungsfreie analytische Technik. Lange Zeit war jedoch fehlende Rechenleistung und damit die Auswertung der komplexen Spektren einer der Hauptgründe für ein mangelndes Interesse an dieser Methode seitens der Pharmazeutischen Industrie und ein Ausschlusskriterium für deren Einsatz in der Routineanalytik. Erst mit Erreichen einer akzeptablen Rechengeschwindigkeit rückte die NIR-Spektrometrie zunehmend in den Fokus von analytischen Abteilungen und gewann auch für die Pharmazeutische Industrie an Attraktivität. Seit einiger Zeit wird die Technik sogar routinemäßig in der Wareneingangskontrolle verwendet. Sie kann aber weitaus mehr.

Da nicht nur die chemische Zusammensetzung, sondern auch physikalische Eigenschaften erfasst werden, hat sich das Einsatzgebiet mittlerweile auch auf die online-Prozesskontrolle erweitert [65,66]. Kleine, unvermeidbare Variationen von Herstellungsparametern, wie Presskraft, Feuchtigkeit und Verteilung des Wirkstoffes,

II. Experimenteller Teil

führen zu Veränderungen im spektralen Verlauf der einzelnen Tabletten. Mittels eines geeigneten Kalibrationsmodells ist es möglich diese Parameter direkt während der Herstellung (engl. = online) zu überwachen [4, 67, 68].

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, ist das Erstellen eines solchen Kalibrationsmodells aus Produktionsproben sehr komplex und zeitaufwendig. Es soll daher im weiteren Verlauf überprüft werden, ob es möglich ist diesen Zeitaufwand mithilfe einer unkonventionellen Herangehensweise nach Blanco und Peguero zu reduzieren [52]. Die Empfindlichkeit des neuen Verfahrens wird mit selbst hergestellten Ibuprofen-Tabletten kontrolliert.

9.1. Proben

Produktionsproben:

Die selbstgefertigten Tabletten enthalten neben dem Wirkstoff (20% m/m Ibuprofen) noch drei weitere Bestandteile. Die genaue Zusammensetzung der 10 Chargen ist in Tab. 9.1 gelistet. Als sogenannte „Ausreißer-Chargen“ werden Charge 9 mit (16% m/m Ibuprofen) und Charge 10 mit (18% m/m Ibuprofen) erstellt.

Nachfolgend wird die Anfertigung der Tabletten für das Projekt „Klassifikation von Chargen“ beschrieben:

Schritt 1:

Zuerst wird die Pulvermischung für die Direkttablettierung hergestellt, wovon ein Teil des Pulvers als Laborreferenz separiert wird (siehe Tab. 9.1). Hierbei werden für die Chargen 1-3 und 5-10 und die Laborproben der ERWEKA Kubus-Mischer verwendet. Es wird jeweils 12 Minuten lang bei 200 Umdrehungen pro Minute gemischt. Bei Charge 4 wird das Herstellungsverfahren bewusst durch Wechsel des Mixers von Kubus auf Turbula[®] Mischer verändert. Mischzeit und Geschwindigkeit wurden aber beibehalten.

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.1: Zusammensetzung der 10 Chargen (Ch) mit Ibuprofen als Wirkstoff, die für das Projekt „Klassifikation von Chargen“ gefertigt wurden.

Gehalt [g]		Ch 1	Ch 2	Ch 3	Ch 4	Ch 5	Ch 6	Ch 7	Ch 8	Ch 9	Ch 10
Ibuprofen	50,0	49,9	49,8	49,9	49,9	50,0	49,9	50,0	49,9	40,4	45,2
Tablettose	160,0	160,1	160,1	160,5	160,1	160,0	160,0	160,0	160,0	168,1	164,1
MCC	37,5	37,6	37,8	37,5	37,6	37,5	37,5	37,5	37,9	39,7	38,1
Talkum	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6
Summe	250,0	250,1	250,2	250,4	250,1	250,0	249,9	250,0	250,3	250,7	250,0

Schritt 2:

Im Anschluss wird diese Pulvermischung mithilfe der Korsch Exzenter Presse gepresst. Der Tablettendurchmesser beträgt 9 mm. Die durchschnittliche Tablettenmasse soll 450 mg und die Bruchfestigkeit 80-110 Nm betragen. Während der Tablettierung erfolgt die Aufteilung jeder Charge in 5 Subchargen. Aus jeder Subcharge werden dann 5 Tabletten als Stichprobe gezogen, sodass eine Gesamtprobenzahl von 25 Tabletten pro Charge resultiert. Dieses Vorgehen wurde bewusst gewählt, damit auch eine Veränderung der physikalischen und chemischen Tabletteneigenschaften während des Herstellungsprozesses überwacht werden kann.

Laborproben:

Aus den 4 Tabletteninhaltsstoffen werden 19 Laborproben (Pulvermischungen) erzeugt. Um den benötigten Anteil jedes Stoffes in der Probe festzulegen, wird ein D-optimales Design verwendet, um den Versuchsaufwand möglichst gering zu halten. Um möglichst hohe Variabilität durch diesen Versuchsplan zu erzeugen, werden 2^n Proben ($n=4$) erstellt. Tabelle 9.2 zeigt den Aufbau des Designs und die zur Probenherstellung verwendeten Einwaagen. Bei den Proben 17-19 handelt es sich um die sogenannten Zentroiden des D-optimalen Designs, die die Mittelwerte der hohen und niedrigen Einstellungen bilden.

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.2: Einwaage der Laborproben, deren Zusammensetzung über das D-optimale Design bestimmt wird.

Nr.	Ibuprofen [g]		Tablettose [g]		MCC [g]		Talkum [g]		Gesamt [g]	
	soll	ist	soll	ist	soll	ist	soll	ist	soll	ist
1	3	3,0107	9,6	9,6039	2,25	2,2509	0,15	0,1529	15	15,0184
2	3	3,0025	9,6	9,6771	2,25	2,2548	0,1	0,0987	14,95	15,0331
3	3	3,0050	9,6	9,6015	1,5	1,5009	0,15	0,1536	14,25	14,2610
4	3	3,0057	9,6	9,6631	1,5	1,5240	0,1	0,1128	14,2	14,3056
5	3	3,0013	6,4	6,4007	2,25	2,3357	0,15	0,1516	11,8	11,8893
6	3	3,0023	6,4	6,4305	2,25	2,2500	0,1	0,1007	11,75	11,7835
7	3	3,0029	6,4	6,3998	1,5	1,5008	0,15	0,1511	11,05	11,0546
8	3	3,0001	6,4	6,4695	1,5	1,5008	0,1	0,1006	11	11,0710
9	2	2,0007	9,6	9,6384	2,25	2,2513	0,15	0,1495	14	14,0399
10	2	2,0034	9,6	9,6118	2,25	2,2495	0,1	0,1216	13,95	13,9863
11	2	2,0022	9,6	9,6196	1,5	1,5018	0,15	0,1497	13,25	13,2733
12	2	2,0008	9,6	9,6327	1,5	1,5016	0,1	0,1031	13,2	13,2382
13	2	1,9998	6,4	6,4005	2,25	2,500	0,15	0,1540	10,8	11,0543
14	2	2,0013	6,4	6,4879	2,25	2,2476	0,1	0,0996	10,75	10,8364
15	2	2,0010	6,4	6,4000	1,5	1,5013	0,15	0,1608	10,05	10,0631
16	2	2,0034	6,4	6,4374	1,5	1,4998	0,1	0,1380	10	10,0786
17	2,5	2,5000	8	8,0000	1,875	1,8750	0,125	0,1250	12,5	12,5000
18	2,5	2,4950	8	8,0000	1,875	1,8750	0,125	0,1250	12,5	12,4950
19	2,5	2,5000	8	8,0000	1,875	1,8750	0,125	0,1250	12,5	12,5000

Die gewählten Konzentrationen für das Design liegt bei $\pm 20\%$ des Nominalgehalts jeder verwendeten Substanz für die Produktionsproben. Das verwendete Design ermöglicht es so Kolinearitäten zwischen den Bestandteilen des Gemisches zu minimieren. Die Mischung wird wegen des geringen Gesamtgewichtes in eine Tüte gewogen und dann in dieser gemischt. Der Endpunkt des Mischvorgangs ist erreicht, wenn drei hintereinander ausgeführte Probenzüge identische NIR-Spektren liefern.

9.2. Prüfparameter

Zuerst werden die selbstproduzierten Tabletten gewogen. Jede Charge wird während der laufenden Produktion in 5-6 Probenbehälter überführt, aus denen wiederum die Proben für die NIR-Messung in diffuser Reflexion mit anschließender potentiometrischer Titration gezogen werden (siehe Tab. 9.7 und 9.8).

9.3. Versuchsdurchführung

9.3.1 Versuchsdurchführung mittels NIR

Für die NIR-Messungen in Reflexion wurde wie in den vergangenen Versuchen auch das NIRFlex N500 der Firma Büchi mit der Messzelle „Solids“ und dem zugehörigen Tabletten- und Vialaufsatz verwendet. Im Messbereich von 10000 bis 4000cm⁻¹ werden 1501 Datenpunkte in 4 cm⁻¹ Schritten aufgenommen.

Die Pulvermischungen der Laborproben werden in Glasvials gefüllt. Vor der Probenmessung wird ein Systemeignungstest durchgeführt. Mit 16 Scans pro Messung werden nun die Proben im „Vial-Add-on“ analysiert. Es werden insgesamt drei Wiederholmessungen durchgeführt. Zwischen den einzelnen Messungen werden die Glasvials geschüttelt.

Für die Proben, die als Tabletten vermessen werden, gilt das folgende Messschema, welches sich solange wiederholt bis alle Proben vermessen wurden:

1. Systemeignungstest (Gerätetest intern)
2. Wellenlängenstandard
3. Tabletten Oberseite und Unterseite jeweils als Dreifach-Messung

9.3.2. Versuchsdurchführung mittels Titration

Die Referenzwerte für die Laborproben werden aus der Einwaage übernommen.

Die Produktionsproben hingegen werden auf ihren Wirkstoffgehalt überprüft. Hier eignet sich ein Titrationsverfahren genauso wie ein HPLC-Verfahren, allerdings bedeutet eine HPLC-Methodenentwicklung einen größeren Aufwand. Daher wurde getestet, ob der Wirkstoff Ibuprofen neben den vorliegenden Hilfsstoffen, in der Matrix, titrimetrisch bestimmt werden kann.

II. Experimenteller Teil

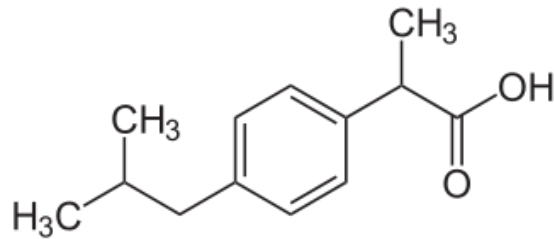


Abb. 9.2: Strukturformel von Ibuprofen, mit der für die Gehaltsbestimmung charakteristischen Carboxylfunktion.

Ibuprofen weist als einzige der vier Substanzen eine funktionelle Gruppe auf, die Carbonsäure, die selektiv quantitativ bestimmbar ist.

Die anderen Bestandteile sind:

1. Tablettose

Dies steht für agglomerierte Lactose (α -Lactose-Monohydrat gemäß Ph. Eur. 7.0). Diese kann saure und alkalische Bestandteile enthalten, welche aber in der Reinheitsprüfung der entsprechenden Arzneibuchmonographie auf einen maximal zulässigen Wert beschränkt sind.

2. Talkum

(Definition: Ausgewähltes, pulverisiertes, natürliches, wasserhaltiges Magnesiumsilikat) Auch hier können saure und alkalische Bestandteile enthalten sein, genau wie bei der Tablettose gibt hier auch hier die Arzneibuchmonographie Grenzen vor.

3. Mikrokristalline Cellulose (MCC), hier macht die entsprechende Arzneibuch-Monographie keine Angabe über die Verunreinigung mit sauren Verunreinigungen.

Ibuprofen kann als organische Säure in Ethanol (96% *R*) nach Zusatz von 1ml HCl (0,1M) mit NaOH (0,1M) titriert werden. Die Zugabe von HCl erfolgt, damit die beiden Äquivalenzpunkte deutlicher erkennbar sind. Die Bestimmung des Endpunktes erfolgt über eine potentiometrische Indikation mit einer pH-sensitiven Glaselektrode.

Die Volumendifferenz zwischen den beiden Äquivalenzpunkten wird für die Berechnung des Gehalts benötigt und in den folgenden Tabellen als Verbrauch gekennzeichnet. Die Methodvalidierung und Bestimmung des Gehalts an Ibuprofen verläuft über drei Schritte. In Schritt 1 wird eine Kalibriergerade mit drei verschiedenen Einwaagen erstellt, um den Zielgehalt des Wirkstoffes in den Tabletten ermitteln zu können (Tab. 9.3 und Abb. 9.3).

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.3: Einwaage des Reinstoffs Ibuprofen und Verbrauch an Maßlösung bei der Titration.

Reinstoff (soll) [mg]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]
50	51,9	2,409
	51,7	2,397
	51,6	2,37
100	100,4	4,541
	100,7	4,558
	100,6	4,582
200	209	9,336
	202,8	9,069
	202,4	9,186

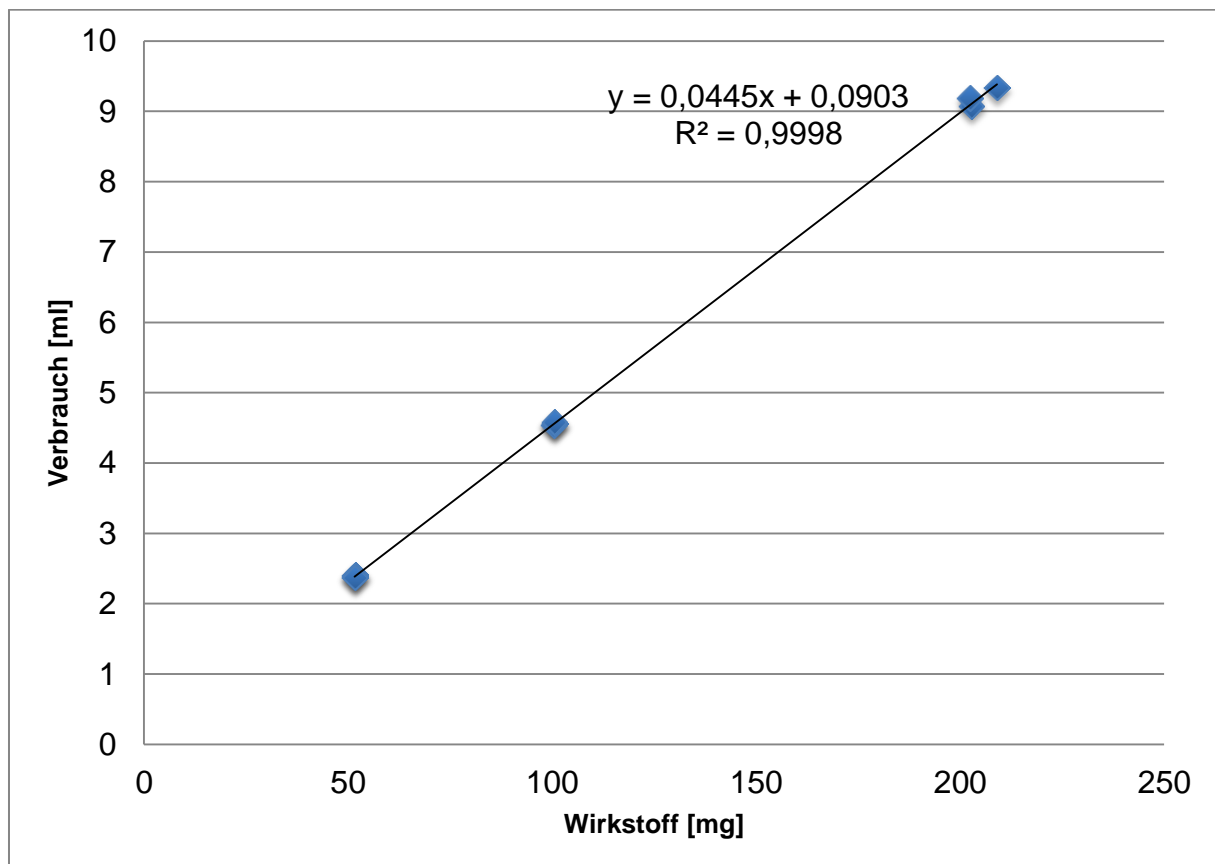


Abb. 9.3: Titration des Reinstoffs Ibuprofen (Einwaage siehe Tabelle 9.3)

II. Experimenteller Teil

Nun wird das Maßanalytische Äquivalent aus der vorliegenden Geradengleichung berechnet:

$$y = 0,0445x + 0,0903$$

Gl. 9.1

Verwendet man 1ml NaOH (0,1M) für die Berechnung als y, ergeben sich 20,44 mg Ibuprofen als Maßanalytisches Äquivalent. Vergleicht man diesen praktisch ermittelten Wert mit dem im Arzneibuch angegebenen theoretischen Wert für diese Gehaltsbestimmung (20,63 mg Ibuprofen), so differiert dieser minimal. Der Grund dafür liegt unter anderem darin, dass Kristallwassergehalt und Verunreinigungen nicht mit berücksichtigt werden. In Schritt 2 wird der Arzneistoff nochmals in denselben drei Konzentrationsbereichen eingewogen, dann aber werden dieser Einwaage noch die anderen Matrixsubstanzen in der Tablettenzusammensetzung zugesetzt. Hierzu wird eine Matrixmischung mit einer Gesamtmasse von 4,003 g erstellt, bestehend aus 3,20 g Tablettose, 751 mg MCC und 52 mg Talkum.

Tab. 9.4: Einwaage des Reinstoffs Ibuprofen und Verbrauch an Maßlösung für dessen Titration in Matrix.

Reinstoff in Matrix (soll) [mg]	Einwaage [mg]	Einwaage [mg] Matrixmischung	Verbrauch [ml] Differenz ($\bar{A}_p2 - \bar{A}_p1$)
50	50,8	360,4	2,362
	51,2	361,0	2,400
	50,5	360,1	2,398
100	101,2	359,9	4,605
	104,4	360,0	4,761
	100,5	360,3	4,592
200	201,2	359,7	9,021
	202,3	360,0	9,072
	201,7	360,2	9,037

II. Experimenteller Teil

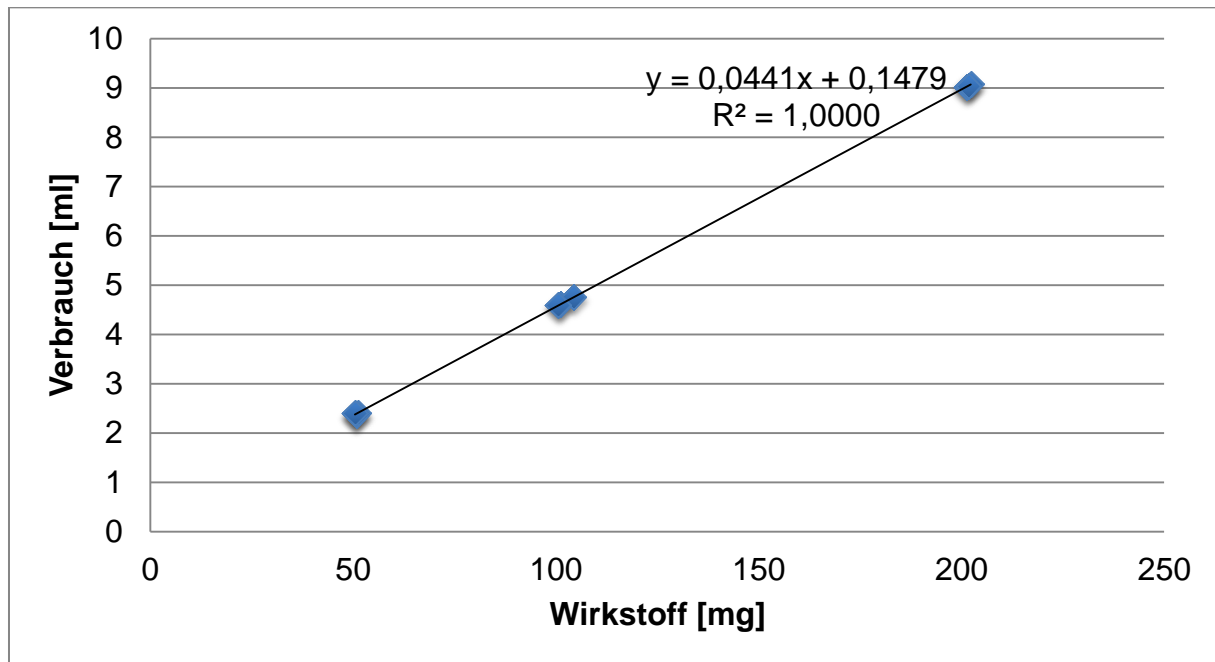


Abb. 9.4: Titration des Wirkstoffs in unveränderter Matrixzusammensetzung

Über die in Abb. 9.4 ermittelte Geradengleichung ($y=b_1x+b_0$) kann nun die Wiederfindung berechnet werden:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{\text{Verbrauch} - b_0}{b_1} \quad \text{Gl. 9.2}$$

Tabelle 9.5 zeigt eine mittlere Wiederfindung von 99,99 % ergibt und so ein Zeichen dafür ist, dass eine Titration von Ibuprofen in der Matrix vollzogen werden kann.

Tab. 9.5: Darstellung der Einwaage Ibuprofen mit Matrix und über Gl. 9.2 berechnete Wiederfindung.

Einwaage [mg]	Verbrauch [ml] Differenz (Äp2 - Äp1)	Wiederfindung [mg]	WFR [%]
50,8	2,362	50,21	98,83
51,2	2,400	51,07	99,74
50,5	2,398	51,02	101,04
101,2	4,605	101,07	99,87
104,4	4,761	104,61	100,20
100,5	4,592	100,77	100,27
201,2	9,021	201,20	100,00
202,3	9,072	202,36	100,03
201,7	9,037	201,57	99,93

II. Experimenteller Teil

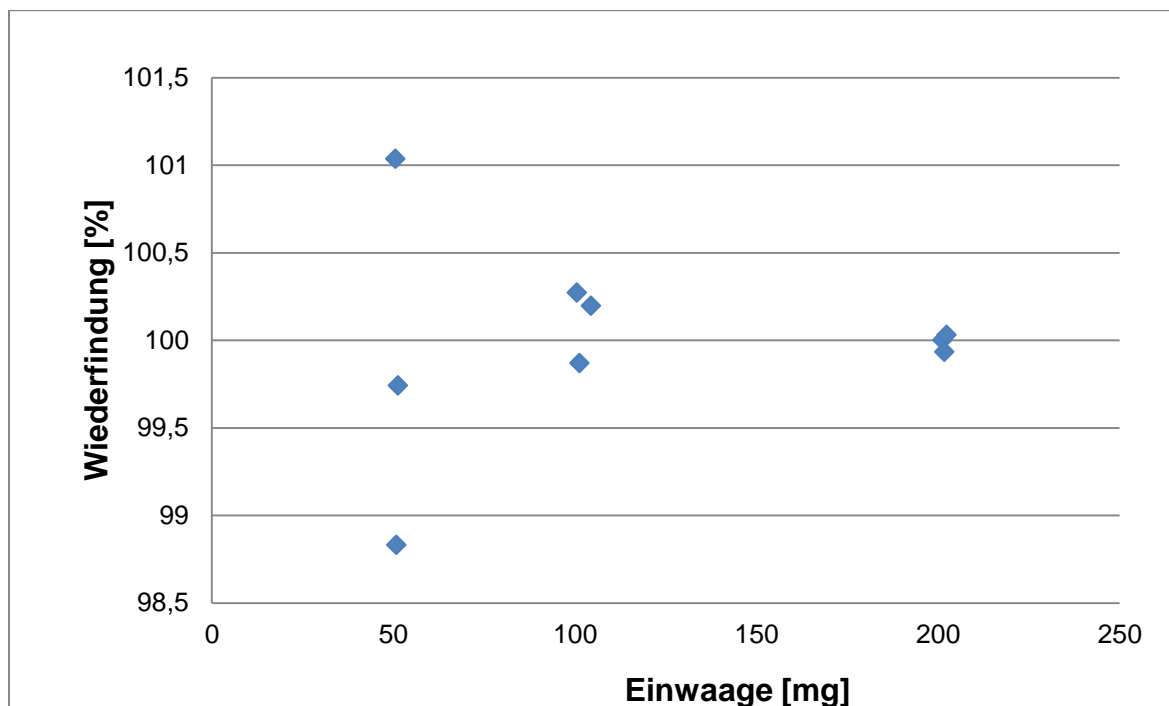


Abb. 9.5: Darstellung der Wiederfindung [%] gegen Einwaage [mg].

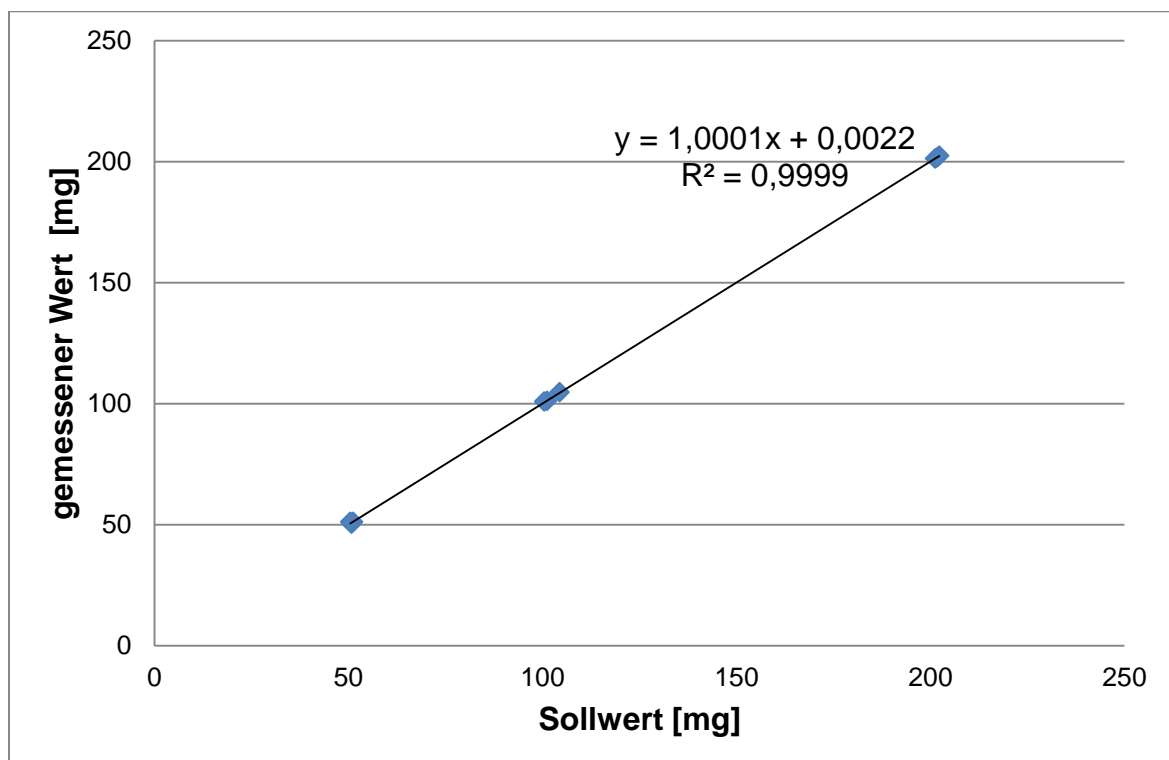


Abb. 9.6: Darstellung des Soll-Ist-Vergleichs. Hier wird der ermittelte Wert für das Ibuprofen der Einwaage, dem Sollwert gegenübergestellt und ergibt somit die Wiederfindungsrate.

II. Experimenteller Teil

Die über lineare Regression ermittelte Gleichung der Gerade des Soll-Ist-Vergleichs (Abb. 9.6) bietet einen Hinweis auf einen möglicherweise vorliegenden Fehler und seine Art:

$$y=1,0001x+0,0022 \quad \text{Gl. 9.3}$$

Wenn die Steigung der Geraden = 1 und der y-Achsenabschnitt = 0 ist, so ist die Richtigkeit nachgewiesen. Ist der y-Achsenabschnitt $\neq 0$, liegt ein konstant systematischer Fehler vor. Ein proportionaler systematischer Fehler liegt vor, wenn die Steigung der Geraden $\neq 1$ ist. Da sowohl der erhaltene y-Achsenabschnitt als auch der Koordinatenursprung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (α) von 5% innerhalb des Konfidenzintervalls (CL = -1,73767529; CU = 1,7342442) liegen, darf aufgrund fehlender statistischer Signifikanz von einem zufälligen Fehler ausgegangen werden. Es wird dabei vernachlässigt, dass auch der Sollwert durch den Wäge-Fehler fehlerbehaftet ist.

Da der y-Achsenabschnitt nicht signifikant ist, kann eine Wiederfindung von 100,0% für die Berechnungen des Gehalts der nachfolgenden Proben verwendet werden.

Im letzten Schritt wird nun die Analyse der Proben durchgeführt. Hierzu wird jede Tablette in einem Achatmörser gemörsert und versucht vollständig direkt in das Probengefäß einzuwiegen. Die eingewogene Masse wird notiert und stellt die Grundlage für die Titration dar.

In den nachfolgenden Tabellen wird der Gehalt über das ermittelte Äquivalent von 22,443 mg und die Wiederfindungsrate von 100,0%, da kein Fehler vorliegt, nach Gl. 9.4 berechnet:

$$\text{Gehalt [\%]} = \frac{\text{Verbrauch ML} \cdot 20,443 \cdot 100,0\%}{\text{Einwaage}} \quad \text{Gl. 9.4}$$

Durch Bedienfehler kam es bei einigen Tabletten zu Fehlmessungen, die in der Tabelle mit einem Gehalt von 0,00% gekennzeichnet wurden, da aus jeder Tablette nur eine Einzelmessung vorgenommen werden kann (siehe Tab. 9.6 und 9.7). Da die Chargen 5 bis 8 mit identischen Lösungsmitteln und Maßlösungen titriert wurden, gilt die Berechnung nach Gl. 9.4 nur für diese Chargen.

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.6: Gehaltsbestimmung der Chargen 1-5 mit den jeweiligen Subchargen 1-5.

	Subcharge 1			Subcharge 2			Subcharge 3			Subcharge 4			Subcharge 5		
	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]
CH1															
Tabl. 1	430,7	4,004	18,60	436,7	4,145	18,99	437,2	4,186	19,15	434,3	4,2	19,35	422,2	3,956	18,74
Tabl. 2	438,8	4,129	18,82	439,9	4,201	19,10	432,5	4,057	18,77	429,1	4,189	19,53	419,9	4,082	19,45
Tabl. 3	434,3	4,003	18,44	433,6	4,361	20,12	428,8	3,972	18,53	445,8	4,328	19,42	425,2	4,07	19,15
Tabl. 4	440,9	4,32	19,60	440,8	3,699	16,79	440,9	4,14	18,78	441,4	4,243	19,23	419,6	4,008	19,11
Tabl. 5	412,9	4,031	19,53	436,1	4,122	18,91	433,2	3,988	18,42	442,6	4,18	18,89	419	3,915	18,69
CH2															
Tabl. 1	446	4,298	19,28	443,6	4,319	19,48	449	4,309	19,20	448,5	4,386	19,56	440,4		0,00
Tabl. 2	442,6	4,282	19,35	438,8	4,184	19,07	440,3	4,293	19,51	446,4	4,326	19,39	439	4,231	19,28
Tabl. 3	444	4,216	19,00	440,1	4,324	19,65	441,6	4,338	19,65	444,2	4,364	19,65	439	4,277	19,49
Tabl. 4	431,2	4,193	19,45	438,6	4,198	19,15	443,4	4,262	19,23	447,8	4,233	18,91	444,8	4,262	19,17
Tabl. 5	445,4	4,281	19,23	447,2	4,343	19,43	444,2	4,307	19,40	436,8	4,234	19,39	450,1	4,375	19,44
CH3															
Tabl. 1	445,3	4,302	19,33	442,3	4,233	19,15	435,1	4,203	19,32	447,5	4,046	18,09	445,6	4,294	19,28
Tabl. 2	445,5	4,204	18,88	445,7	4,268	19,16	441,4	4,223	19,14	440,9	4,2433	19,25	444,4	4,251	19,14
Tabl. 3	409,4	3,93	19,20	444,1	4,227	19,04	444,2	4,255	19,16	441,1		0,00	449	4,252	18,94
Tabl. 4	446,9	4,222	18,90	449,7	4,356	19,38	441,2	4,278	19,40	440,8	4,155	18,86	424,5	4,045	19,06
Tabl. 5	447,7	4,294	19,19	447,4	4,308	19,26	435,4	4,173	19,17	437,5	4,247	19,42	442,5	4,24	19,17
CH4															
Tabl. 1	450,9	3,981	17,66	442,5	4,326	19,56	453,5	4,509	19,89	454,5	4,35	19,39	449,7	3,838	17,07
Tabl. 2	455,2	3,894	17,11	451,8	4,208	18,63	450,6	4,093	18,17	452,6	4,493	20,11	436,8	4,13	18,91
Tabl. 3	461,5	3,927	17,02	449,5	4,488	19,97	448,9	4,432	19,75	448	4,182	18,91	439,5	4,144	18,86
Tabl. 4	449,5	4,742	21,10	450,4	3,843	17,07	456,4		0,00	455,5	4,431	19,71	449,5	4,399	19,58
Tabl. 5	457,6	3,937	17,21	453	3,874	17,11	447	4,368	19,55	451	4,824	21,67	446,2	5,083	22,79
CH5															
Tabl. 1	472,5	4,361	18,70	459,4	4,14	18,26	463,8	4,222	18,44	461	4,241	18,64	471,3	4,318	18,56
Tabl. 2	462,7	4,168	18,25	462,1	4,2	18,42	469,3	4,292	18,53	476,4	4,658	19,81	461,2	4,24	18,63
Tabl. 3	463,2	4,262	18,64	467,9	4,267	18,48	475	4,273	18,23	470	4,193	18,08	474,2	4,279	18,28
Tabl. 4	472,9	4,243	18,18	475,6	4,434	18,89	467,2	4,347	18,85	466,7	4,171	18,11	456,5	4,345	19,28
Tabl. 5	470,2	4,223	18,20	480	4,325	18,26	478,3	4,369	18,51			0,00	477,4	4,348	18,45

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.7: Gehaltsbestimmung der Chargen 6-10 mit den jeweiligen Subchargen 1-5.

	Subcharge 1			Subcharge 2			Subcharge 3			Subcharge 4			Subcharge 5		
	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml]	Gehalt [%]
CH6															
Tabl. 1	467,7	4,189	18,15	475,5	4,188	17,85	472,1	4,239	18,19	476,5	4,283	18,21			0,00
Tabl. 2	471,7	4,155	17,85	472,4	4,17	17,88	468,9	4,233	18,29	476,3	4,255	18,10	471,1	4,275	18,39
Tabl. 3	474,6	4,268	18,22	471,1	4,113	17,69	473,4	4,28	18,32	471,1	4,265	18,34	469,5	4,26	18,38
Tabl. 4	469,9	4,144	17,87	479,6	4,333	18,31	468,4	4,305	18,62	473	4,281	18,34	476,3	4,286	18,23
Tabl. 5	473,9	4,241	18,13	466,9	4,205	18,25	477,1	4,308	18,29	470,2	4,198	18,09	470,9	4,234	18,22
CH7															
Tabl. 1	459,4	4,104	18,10	474,5	4,275	18,25	471,5	4,273	18,36	468,6	4,273	18,48			0,00
Tabl. 2	466,2	4,273	18,57	468,7	4,255	18,39	470,6	4,244	18,27	472,2	4,314	18,51	472,3	4,309	18,49
Tabl. 3	469,2	4,199	18,13	467,4	4,234	18,35	472,8	4,296	18,41	467,8	4,261	18,45	467,3	4,225	18,32
Tabl. 4	462,5	4,11	18,00	466,6	4,193	18,21	471,9	4,263	18,30	473,8	4,311	18,44	479,2	4,288	18,13
Tabl. 5	461,2	4,148	18,22	463,5	4,214	18,42	472,1	4,29	18,41	467,8	4,324	18,73			0,00
CH8															
Tabl. 1	457,8	4,16	18,41	461,6	4,198	18,43	476,7	4,313	18,33	479,1	4,389	18,56			0,00
Tabl. 2	465,3	4,229	18,41	459,1	4,114	18,16	461	4,332	19,04	472,6	4,332	18,57	476,1	4,237	18,03
Tabl. 3	460,7	4,236	18,63	475,3	4,306	18,36	470,9	4,282	18,42	473,2	4,282	18,33	474,7	4,275	18,25
Tabl. 4	464,1	4,217	18,41	468,5	4,236	18,32	467,6	4,202	18,21	455,6	4,202	18,69	461,7	4,239	18,60
Tabl. 5	464,1	4,205	18,36	466,5	4,266	18,53	467,1	4,31	18,70	476,1	4,31	18,34	465,2	4,247	18,50
CH9															
Tabl. 1	474,4	3,558	15,00	479,9	3,517	14,66	485,2	3,571	14,72	475,5	3,43	14,43	482,4	3,667	15,21
Tabl. 2	474,8	3,543	14,93	477,7	3,453	14,46	476,4	3,446	14,47	476,3	3,587	15,07	471,7	3,506	14,87
Tabl. 3	485	3,586	14,79	481,7	3,484	14,47	478,7	3,547	14,82	477,7	3,56	14,91	485,9	3,646	15,01
Tabl. 4	479,3	3,528	14,73	478,7	3,476	14,53	484,7	3,701	15,28			0,00	483,4	3,552	14,70
Tabl. 5	480,4	3,595	14,97			0,00	476,7	3,569	14,98			0,00	484,6	3,655	15,09
CH10															
Tabl. 1	475,2	3,995	16,82	478,3	3,989	16,68	471,5	3,823	16,22	470,3	3,967	16,87	485,5	3,957	16,30
Tabl. 2	480,2	3,975	16,56	476,5	3,968	16,66	474,6	3,901	16,44	473,8	3,94	16,64	476	4,006	16,84
Tabl. 3	473,8	3,898	16,46	476	3,812	16,02	477,6	3,904	16,35	483,3	4,017	16,63	477,8	3,927	16,44
Tabl. 4	464,3	3,885	16,74	470,5	3,878	16,49	469,2	3,864	16,47	480,9	4,023	16,74	474,2	4,057	17,12
Tabl. 5	478,9	3,882	16,22	472	3,882	16,45	471,4	3,85	16,34	477	3,993	16,75	472,9	4,017	16,99

II. Experimenteller Teil

Da nicht alle 10 Chargen hintereinander mit identischen Lösungsmitteln und Maßlösungen titriert werden konnten, musste eine weitere Kalibration durchgeführt werden. Der Gehalt der Chargen 1 bis 4 und 9, 10 wird mit den nachfolgenden Daten zur Kalibrierung berechnet, da diese Proben in zeitlicher Einheit bestimmt wurden.

Tab. 9.8: Einwaage des Reinstoffs Ibuprofen und Verbrauch an Maßlösung bei der Titration (CH.1-4, 9, 10).

Reinstoff (soll) mg]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml] Differenz (Äp2 - Äp1)
50	50,5	2,417
	51,1	2,407
	51,2	2,434
100	101,3	4,782
	101,3	4,761
	103,2	4,894
200	199,1	9,264
	199,7	9,335
	202,1	9,424

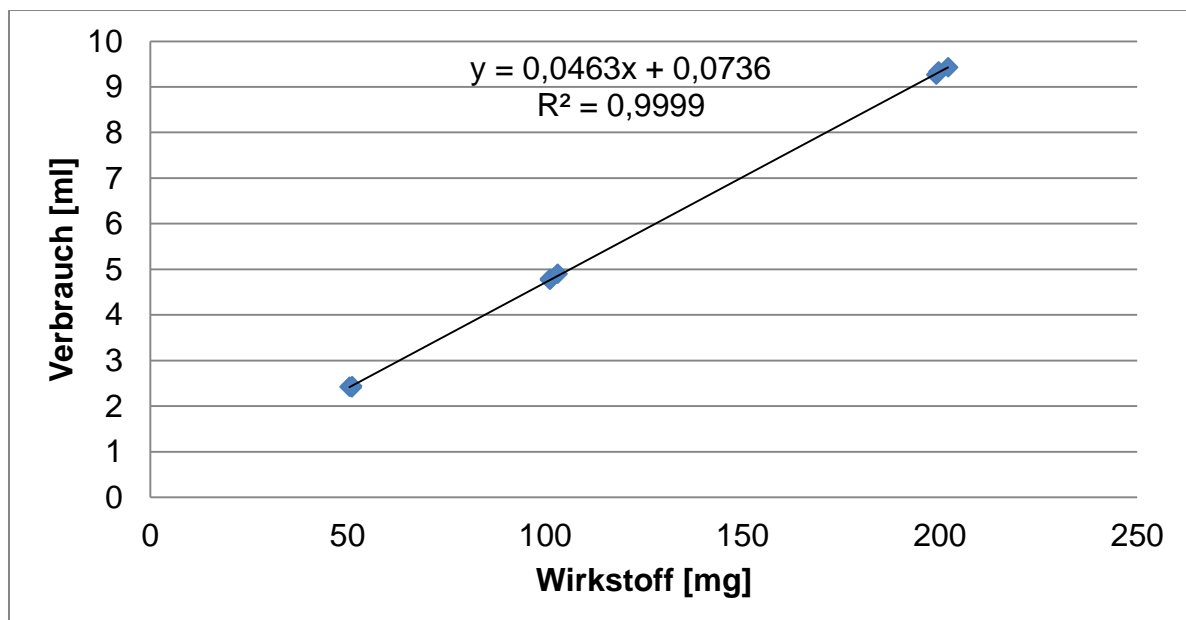


Abb. 9.7: Titration des Reinstoffs Ibuprofen (Einwaage siehe Tabelle 9.8)

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.9: Einwaage des Reinstoffs Ibuprofen und Verbrauch an Maßlösung für dessen Titration in Matrix.

Reinstoff in Matrix (soll) [mg]	Einwaage [mg]	Verbrauch [ml] Differenz (Äp2 - Äp1)
50	50,4	2,43
	52,5	2,433
	49,5	2,354
100	100,8	4,728
	101	4,771
	100,7	4,692
200	200,9	9,346
	204,3	9,595
	199,7	9,311

Tab. 9.10: Darstellung der Einwaage Ibuprofen mit Matrix und über Gl. 9.2 berechnete Wiederfindung.

Einwaage mg]	Verbrauch [ml] Differenz (Äp2 - Äp1)	Wiederfindung [mg]	WFR [%]
50,4	2,43	51,33	101,84
52,5	2,433	51,39	97,89
49,5	2,354	49,69	100,39
100,8	4,728	100,75	99,95
101	4,771	101,67	100,66
100,7	4,692	99,97	99,28
200,9	9,346	200,06	99,58
204,3	9,595	205,41	100,54
199,7	9,311	199,31	99,80

Für die Auswertung der Chargen 1-4 und 9,10 wurde die Berechnung nach Gl. 9.5 durchgeführt. Auch hier liegt der y-Achsenabschnitt berechnet mit $\alpha=5\%$ innerhalb des Konfidenzintervalls (CL = -1,73767529; CU = 1,7342442).

$$\text{Gehalt [\%]} = \frac{\text{Verbrauch} * 20,001 * 100,0\%}{\text{Einwaage}} \quad \text{Gl. 9.5}$$

II. Experimenteller Teil

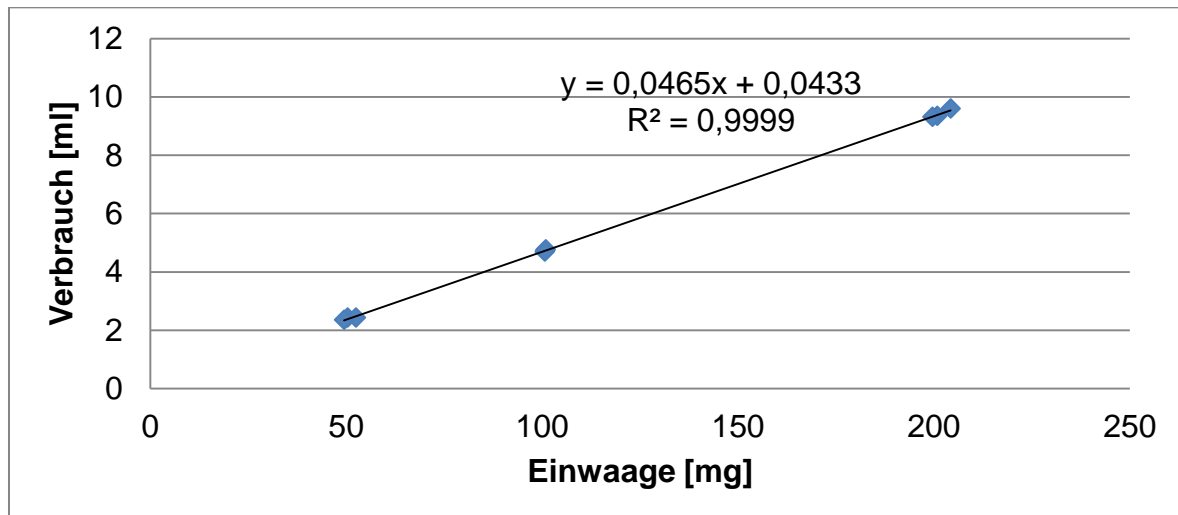


Abb. 9.8: Titration des Wirkstoffs in unveränderter Matrixzusammensetzung

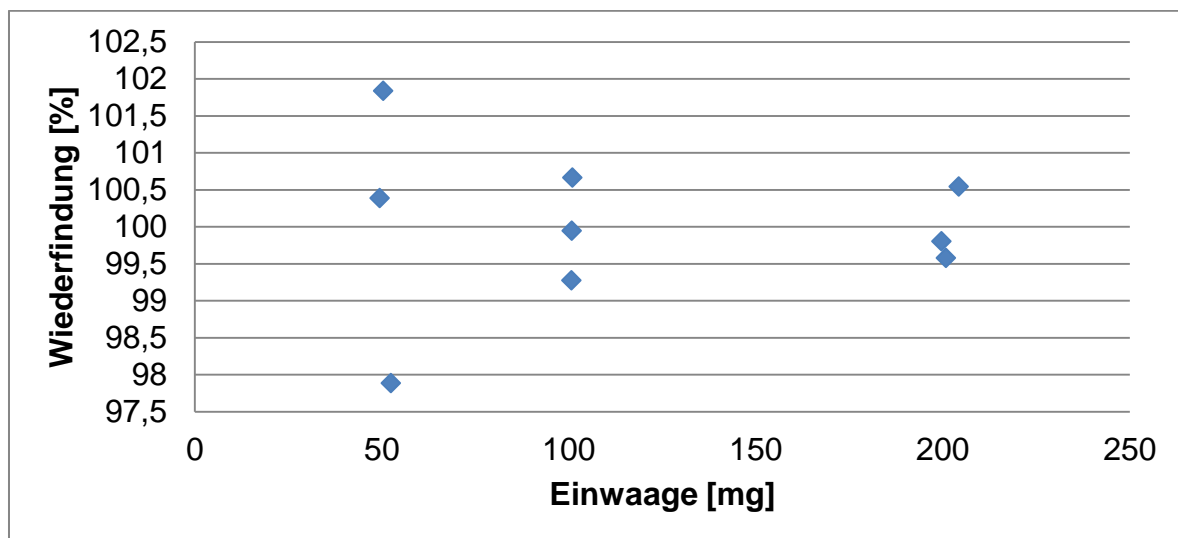


Abb. 9.9: Darstellung der Wiederfindung [%] gegen Einwaage [mg]

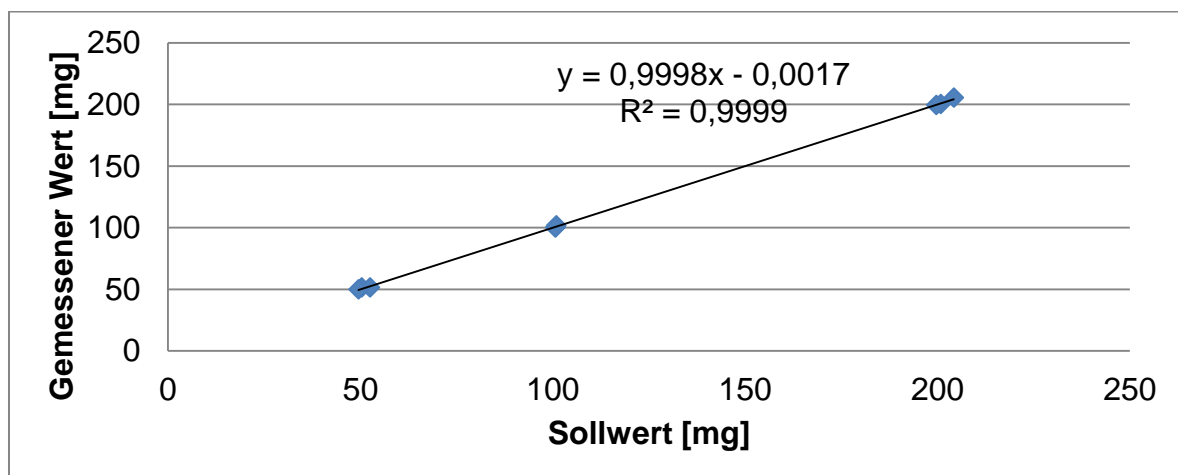


Abb. 9.10: Darstellung des Soll-Ist-Vergleichs. Hier wird der ermittelte Wert für das Ibuprofen der Einwaage, dem Sollwert gegenübergestellt.

9.4. Auswertung und Ergebnisse

Titration:

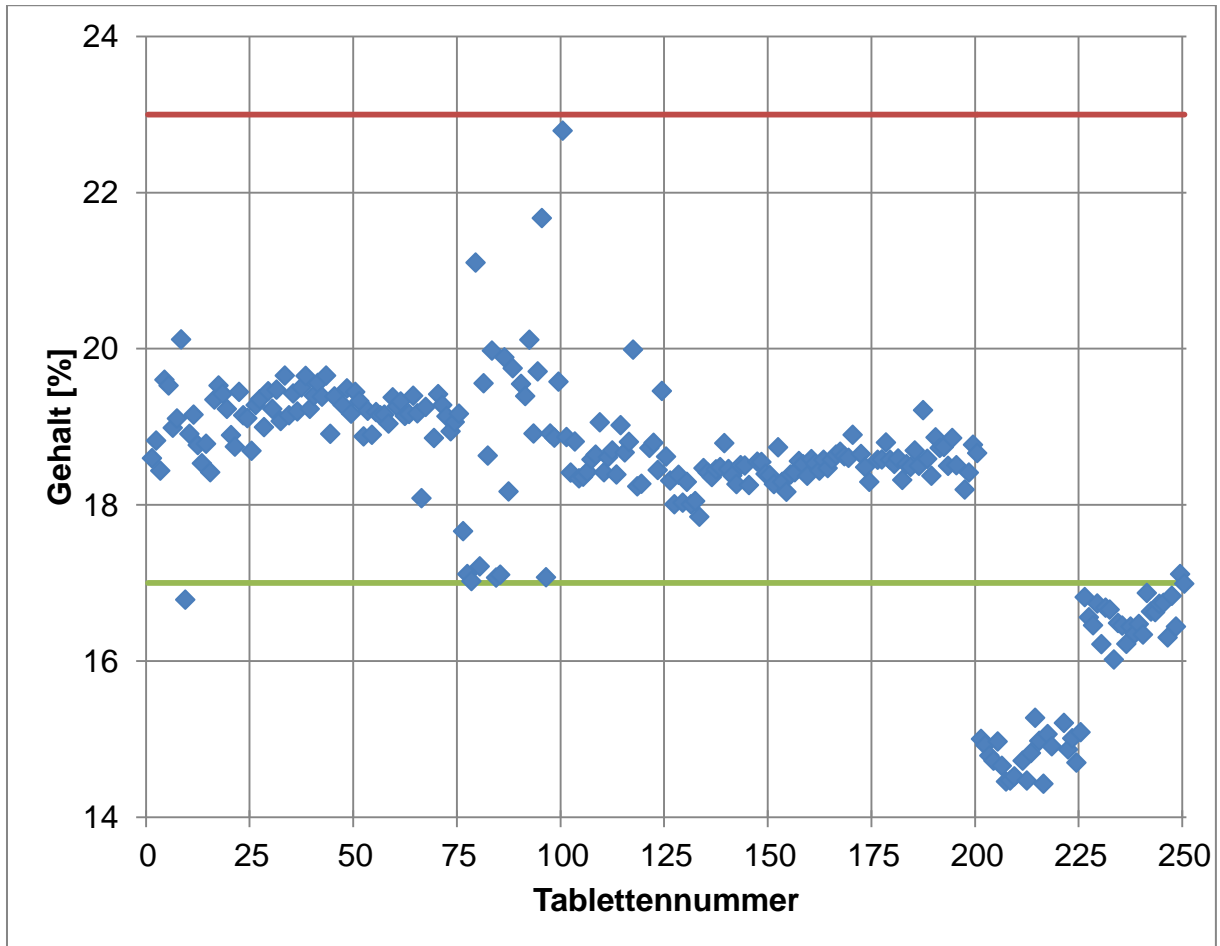


Abb. 9.11: Darstellung der Einzeltablettengehalte in einer Kontrollkarte. Die grüne und rote Linie stellen die festgelegten Grenzwerte von $\pm 15\%$ um den Nominalgehalt der Tabletten dar. Je 25 Tabletten sind eine Charge.

Der berechnete mittlere Gehalt der Chargen 1 bis 8 beträgt 18,55% (Abb. 9.11). Das Europäische Arzneibuch lässt bei der Herstellung von festen Arzneiformen auf Gleichförmigkeit des Gehalts im Kapitel 2.9.6 prüfen. Die Grenzwerte dieser Prüfung können genutzt werden, um die Qualität der Tabletten aus eigener Herstellung zu beurteilen. Die obere und untere Grenze der Werte der Einzeltablette wird, wie in Abb. 9.11, bei $\pm 15\%$ des Nominalgehalts von 20% festgelegt. Wenn man alle Chargen (25 Tabletten wurden pro Charge untersucht) betrachtet, fällt eine große Streuung der Werte im Bereich Tablettennummer 75-100 auf. Grund hierfür ist die Nutzung des Turbulamischers anstelle des Kubusmischers bei der Herstellung von Charge 4. Hier ist das Ibuprofen in der Mischung nicht so homogen verteilt, wie es durch den optimierten Herstellungsprozess mit dem Kubusmischer gewährleistet

II. Experimenteller Teil

werden kann. Weiterhin kommt es in Charge 1 zu Unregelmäßigkeiten, die sich aus der Ungeübtheit des Operators ergeben. Als letztes lassen sich hervorragend Charge 9-10 (Tablettennummer 200-250) erkennen, die als Ausreißerchargen mit 16% bzw. 18% Gehalt (nominal) erzeugt wurden.

NIR:

Die Auswertung der zuvor erzeugten NIR-Spektren erfolgt nach der in Kapitel 5 beschriebenen Arbeitsvorschrift von M. Blanco et al. [52]. Es soll aus den vorliegenden Spektren eine Datenmatrix erzeugt werden, die nicht nur chemische, sondern auch physikalische Variabilität enthält. Mit diesen Daten soll ein NIR-Modell entwickelt werden, dass zur Vorhersage von unbekannten Daten genutzt werden soll. Um dieses Modell erstellen zu können sind die Arbeitsschritte aus Kapitel 5 nötig. Im Folgenden wird die Auswertung des Projekts unter Zuhilfenahme der einzelnen Arbeitsaufgaben durchgeführt:

Aufgabe 1: Erstellung der geschätzten Prozessspektren und der „RPVM“

Die geschätzten Prozessspektren werden durch Subtraktion der Laborreferenz von ausgewählten Produktionsproben erzeugt. Die Laborreferenz ist dabei das Referenzspektrum, das beim Vermessen der Pulvermischung mit dem Nominalgehalt an Wirkstoff und Matrix erhalten wird. Diese Verfahrensweise wurde für drei Chargen durchgeführt. Hierbei wurden je 3 Tabletten aus der Mittelproduktion jeder Charge zufällig gezogen. In Abb. 9.12 ist das einzelne Spektrum für eine Tablette exemplarisch dargestellt. Der aus 9 Spektren bestehende Datensatz wurde von Blanco [52] „Reduzierte Prozessvariabilitätsmatrix“ kurz „RPVM“ genannt, die Bildung dieses Datensatzes erfolgt nach Abb. 5.2.

II. Experimenteller Teil

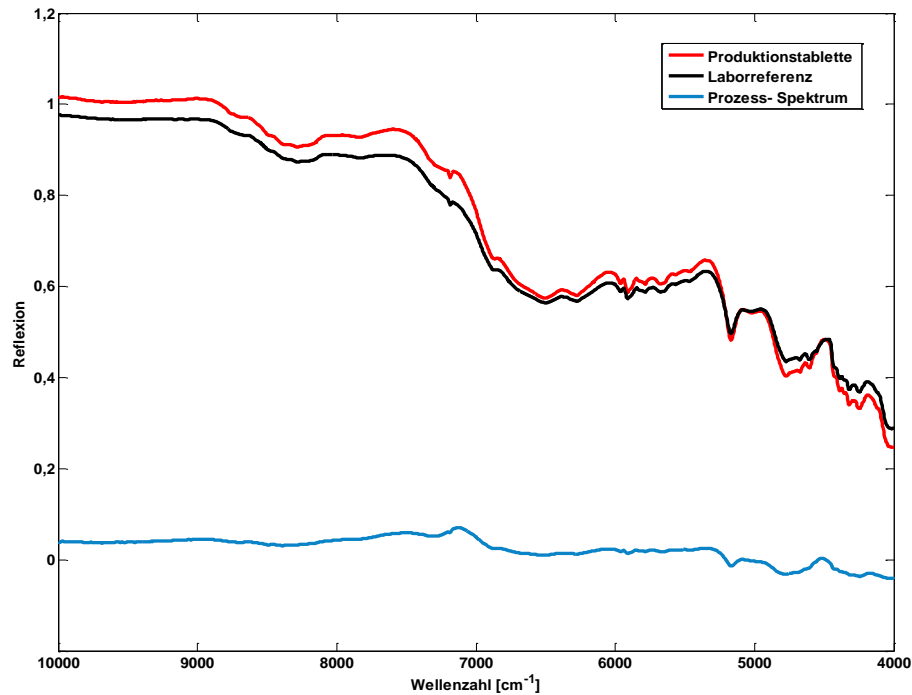


Abb. 9.12: Darstellung des Prozessspektrums für eine Tablette. Detaillierte Beschreibung der Berechnung ist in Kapitel 5 dargestellt.

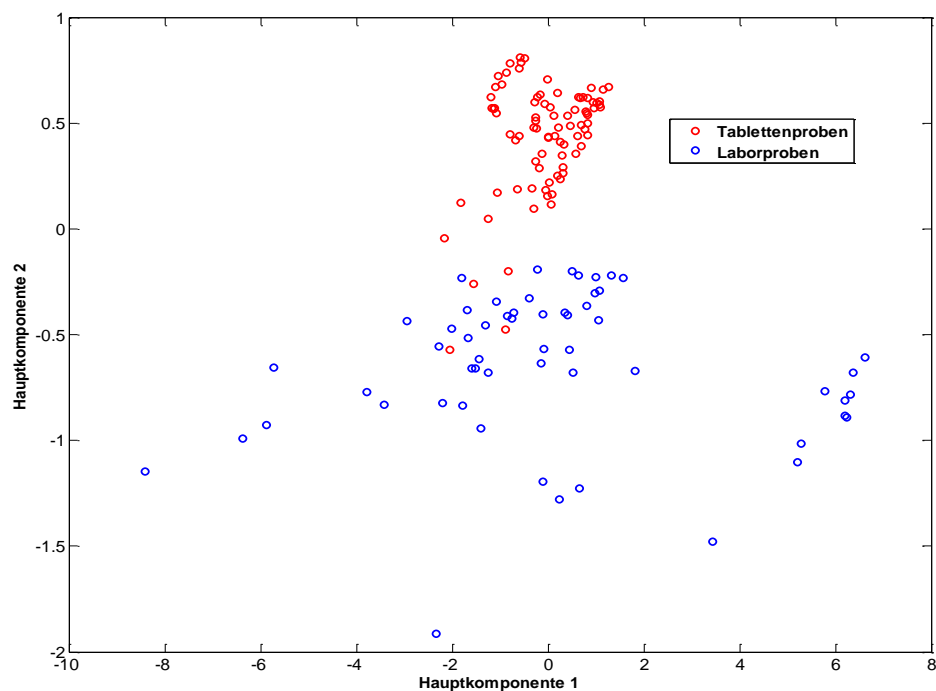


Abb. 9.13: Darstellung der ersten zwei Hauptkomponenten von Tabletten- und Laborprobe. Die Tablettenproben liegen noch nicht mit den Laborproben in einer Datenwolke.

Betrachtet man Abb. 9.13, stellt man fest, dass die Laborproben, die als Kalibrierdaten verwendet werden sollen, noch nicht mit den Tablettenproben zur

II. Experimenteller Teil

Deckung gebracht werden können. Da hier aber eine Kalibration stattfinden soll, stellt dies nun das Ziel der folgenden beiden Aufgabenteile dar.

Aufgabe 2:

In normalen NIR-Kalibrierungen sind Proben aus vielen Chargen notwendig, um ausreichende physikalische Variabilität in das Modell einzubringen. In diesem Fall wird diese Variabilität über die Multiplikation der zuvor erstellten Matrix „RPVM“ mit einem Faktor (f) multipliziert, sodass 36 Spektren resultieren. Die 4 verschiedenen Faktoren haben die Werte 0,25, 0,5, 0,75 und 1,00. Vorerst werden die Faktoren willkürlich festgelegt. Durch Projektion der Daten in den Hauptkomponentenraum werden sie in Schritt 3 beurteilt und wenn nötig variiert. So entsteht die „EPVM“, die erweiterte Prozess-Variabilitäts-Matrix (siehe Abb. 5.3).

Aufgabe 3:

Nun werden die Spektren der Laborproben (48) zufällig auf die erweiterten Prozessvariabilitätsmatrix „EPVM“(36) addiert (siehe Abb. 5.4). Es resultiert die „Erweiterte totale Variabilitätsmatrix“ kurz ETVM, die nun bei der Modelbildung zur Kalibrierung und Validierung genutzt wird. Hier wurde nun mittels zweier verschiedener Ansätze versucht die ETVM zu bilden.

Zuerst entstand eine Matrix, die 48 Spektren enthält. Dazu wurde auf jede Laborprobe (48 Stück) jeweils zufällig ein Spektrum der mit verschiedenen Faktoren multiplizierte RPVM (36 Stück) addiert. Bei dieser Addition ist aufgrund der geringen Spektrenzahl nur ein Ziehen mit Zurücklegen möglich, dadurch verläuft die Verteilung der mit verschiedenen Faktoren multiplizierten Prozess-Spektren nicht gleichmäßig sondern zufällig.

II. Experimenteller Teil

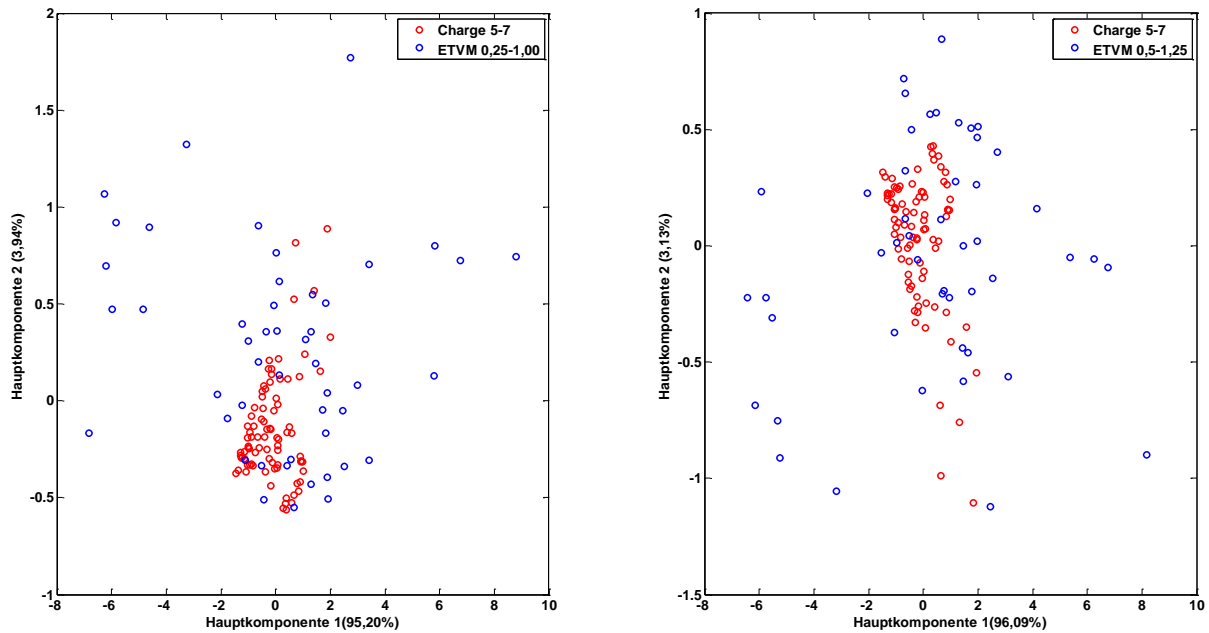


Abb.9.14: Die hier dargestellten Tablettenchargen (rot) und die ETVM-Spektren (blau) bilden eine Datenwolke.

Über die Visualisierung der Tablettenchargen und des gebildeten ETVM im Hauptkomponentenraum wird nun entschieden, ob die vorgenommene Multiplikation mit anderen Faktoren wiederholt werden muss. In diesem Fall wurden die Faktoren nochmals so variiert, dass ein Faktor >1 dazu genommen wurde und der kleinste entfernt wurde. So lautet die Faktoren (f) wie folgt: 0,5 0,75 1,00 und 1,25. Die Hauptkomponentendarstellung der Faktorenvariation wird in Abb. 9.14 gezeigt.

Die zweite Matrix enthält 192 Spektren. Hier wurde nun zufällig für jede Laborprobe aus jedem Faktorenblock ein Spektrum des RPVM ausgewählt, das addiert wird. So wird nun jede Laborprobe 4-mal addiert woraus $192 (4 \cdot 48 = 192)$ Spektren resultieren, womit mehr physikalische Einflüsse mittels ETVM abgebildet werden können.

II. Experimenteller Teil

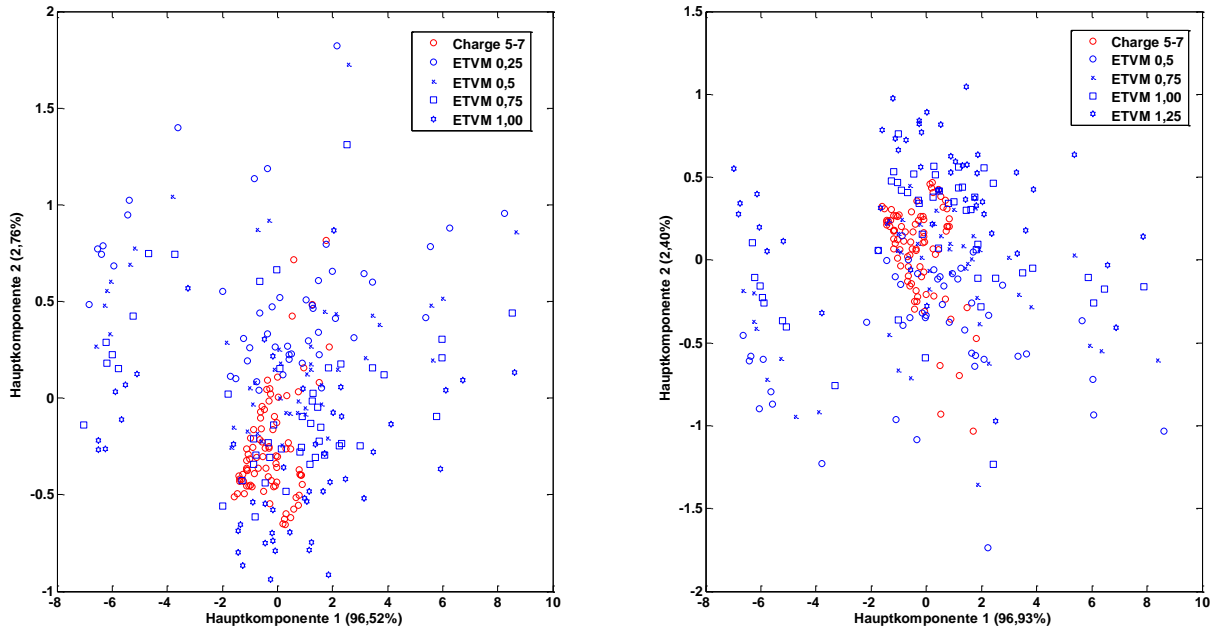


Abb. 9.15: Die über den zweiten Prozess erzeugte ETVM-Matrix ist nun 192 Spektren groß. Im Hauptkomponentenplot wird der Einfluss der Faktorisierung deutlich. Es wurden dabei für die Erzeugung der Matrix jeweils 2 verschiedene Faktorensätze verwendet.

Nachdem in Aufgabe 3 eine Matrix erzeugt wurde, auf deren Basis die Vorhersage der Tablettspektren erfolgen soll, werden diese Daten nun verwendet um ein PLS-Modell zu erstellen. Dieses wird mit Hilfe einer Kreuzvalidierung überprüft.

Es wäre möglich nur bestimmte Teilbereiche des Spektrums zu verwenden, aber hier wird keine Wellenlängenselektion durchgeführt. Stattdessen wird für alle Berechnungen auf dem gesamten Wellenlängenbereich gearbeitet. Weiterhin werden, um Streulicht zu reduzieren verschiedene Kombinationen von Datenvorbehandlungen ausprobiert. Die endgültig ausgewählte, beste Kombination ist eine erste Ableitung nach Savitzky und Golay mit einem Polynom 3. Ordnung über 15 Datenpunkte (Siehe 4.1.2) und eine Streulichtkorrektur mittels SNV (Siehe 4.1.3). Die Ergebnisse der Validierung der Modelle und die Vorhersageergebnisse der verschiedenen Chargen wird in den Tab. 9.11 und 9.12 dargestellt. Ziel bei der Modellbildung mit Kreuzvalidierung ist es, eine optimale Faktorenanzahl zu ermitteln und damit einen möglichst präzise Vorhersage zu erhalten. Dazu wird der R^2_{cv} maximiert. Der $RMSEP_{Test}$ gibt den mittleren Vorhersagefehler unbekannter Proben an. Seine Einheit ist dieselbe wie die der abhängigen Variablen y .

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.11: Zusammenfassung der Ergebnisse des berechneten PLS-Modells mit LOO-Kreuzvalidierung für die in Schritt 3 gebildete Matrix mit 48 Spektren und die Vorhersage der verschiedenen Testdaten.

Trainingsdaten ETVM	Testdaten [Chargennr.]	Daten- vorbehandlung	PLS- Faktoren	R^2_{cv}	RMSEP _{Test} [%]
zufällig [48*1501], m=0,25-1,0	1-10	- snv, savgo	11 6	0,837 0,721	1,53 1,66
zufällig [48*1501], m=0,25-1,0	1-3+5-8	- snv, savgo	11 6	0,837 0,721	1,22 1,59
zufällig [48*1501], m=0,25-1,0	1-3+5-10	- snv, savgo	11 6	0,837 0,721	1,60 2,16
zufällig [48*1501], m=0,5-1,25	1-10	- snv, savgo	11 8	0,846 0,822	1,90 2,21
zufällig [48*1501], m=0,5-1,25	1-3+5-8	- snv, savgo	11 8	0,846 0,822	1,29 1,47
zufällig [48*1501], m=0,5-1,25	1-3+5-10	-- snv, savgo	11 8	0,846 0,822	1,79 2,00

Das beste Ergebnis in den Tabellen 9.11 und 9.12 liefert die ETVM, bei der der ermittelte R^2_{cv} möglichst nahe an 1,0 liegt und die Vorhersage der Testdaten dabei einen möglichst kleinen Vorhersagefehler besitzen. Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes, wie in Kap. 4.5 beschrieben erfolgt nach Gleichung 4.21. In den beiden Tabellen wurden auch die verschiedenen Chargen in separate Testblöcke eingeteilt, um beispielsweise Charge 4 (Mischgüte nicht gegeben, siehe Ergebnis Titration) aus der Vorhersage herauszunehmen. Weiterhin wurde die Chargen, die in ihrer Herstellung nicht identisch sind, (Chargen 4, 9 und 10) aus der Vorhersage herausgenommen. Ein Herauslassen von fehlerbehafteten Chargen führt zu einer Senkung des RMSEP_{Test}.

II. Experimenteller Teil

Tab. 9.12: Zusammenfassung der Ergebnisse des berechneten PLS-Modells mit LOO-Kreuzvalidierung für die in Schritt 3 gebildete Matrix mit 192 Spektren und die Vorhersage der verschiedenen Testdaten.

Trainingsdaten ETVM	Testdaten [Chargennr.]	Daten- vorbehandlung	PLS- Faktoren	R^2_{cv}	RMSEP _{Test} [%]
blockw. zuf. [192*1501], m=0,25-1,0	1-10	- snv, savgo	11 11	0,945 0,959	2,62 1,71
blockw. zuf. [192*1501], m=0,25-1,0	1-3+5-8	- snv, savgo	5 5	0,678 0,822	1,45 1,01
blockw. zuf. [192*1501], m=0,25-1,0	1-3+5-10	- snv, savgo	5 5	0,678 0,822	2,14 1,51
blockw. zuf. [192*1501], m=0,5-1,25	1-10	- snv, savgo	11 11	0,942 0,959	2,38 2,19
blockw. zuf. [192*1501], m=0,5-1,25	1-3+5-8	- snv, savgo	5 4	0,672 0,772	1,40 1,00
blockw. zuf. [192*1501], m=0,5-1,25	1-3+5-10	-- snv, savgo	5 4	0,672 0,772	2,06 1,39

Das beste Ergebnis für die Kalibrierung in dem Konzentrationsbereich zwischen 16% und 24% Ibuprofen wird mit einer kombinatorischen Datenvorbehandlung, bestehend aus Streulichtkorrektur mittels SNV (Kap. 4.1.3) und der ersten Ableitung nach Savitzky-Golay-Ableitung (Kap. 4.1.2), über das gesamte Spektrum erzielt. Als Datengrundlage wurde eine ETVM genutzt, die durch blockweise zufälliges Ziehen aus der EPVM (Matrix mit 192 Spektren) erzeugt wurde. Hier wird auf dem großen Datensatz (192 Spektren) zur Kalibration mit 4 PLS-Faktoren ein RMSEP_{Test} von 1,00 % erreicht. Identisch hergestellte Chargen eines Arzneimittels lassen sich hinsichtlich ihrer NIR-Spektren nicht signifikant unterscheiden. Wenn allerdings zulassungsrelevante Schritte während des Herstellungsprozesses variiert werden,

II. Experimenteller Teil

wie es in diesem Arbeitsabschnitt durch Veränderung des Mischers mit Charge 4 geschehen ist, führt dies unweigerlich zu einer Prozessvariabilität. Diese Schwankungen des Gehalts finden sich in Abb. 9.16 als Charge 4 (Tabl.-Nr. 73-98).

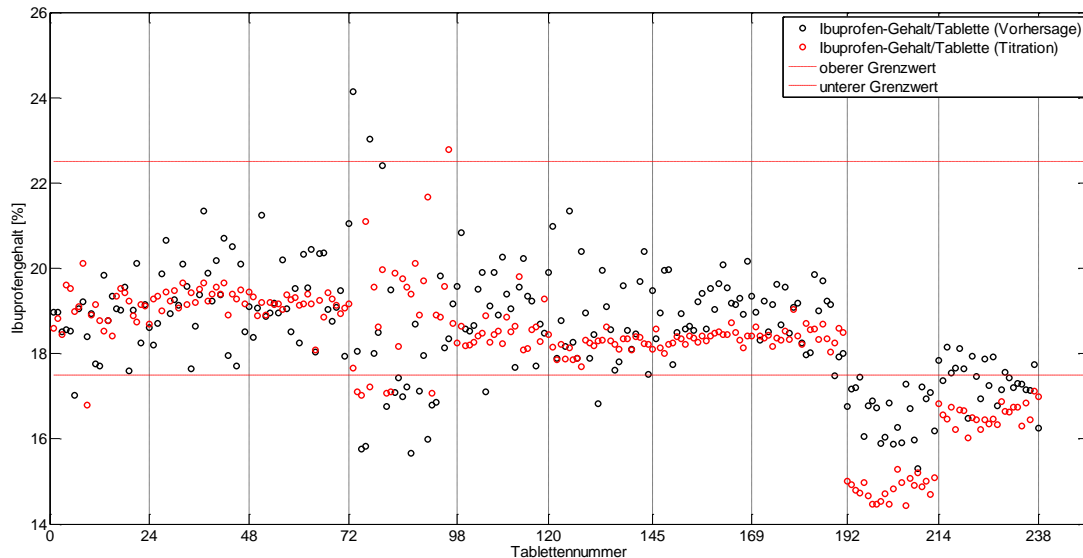


Abb. 9.16: Hier dargestellt sind die Ergebnisse der Titration, aufgetragen gegen die beste Vorhersage der Einzelgehalte aller selbstgepressten Tabletten.

Das in diesem Kapitel vorgestellte Vorgehen von Blanco und Peguero, bei dem Pulverspektren mit nur wenigen Produktionsproben kombiniert werden, stellt eine Methode mit viel Potential dar, die sich sogar als wegweisend auf diesem Gebiet herausstellen könnte. Im Vergleich zu einer konventionellen Kalibration wird hier eine sehr viel kleinere Probenzahl benötigt, woraus ein deutlich geringerer zeitlicher Aufwand resultiert. Dabei muss jedoch auf bestimmte Details besonders geachtet werden, da ansonsten fehlerhafte Ergebnisse zustande kommen.

Eine mögliche Fehlerquelle liegt in der Auswahl der Spektren, die für die Berechnung des Prozessspektrums verwendet werden.

Die andere Fehlerquelle liegt in der Bildung der falschen Matrizen, die zur Simulation der Variabilität der Kalibrationsspektren genutzt werden.

Wenn, wie häufig in der Praxis, nicht genügend Proben zur Verfügung stehen, dann ist die Vorgehensweise nach Blanco und Peguero die Methode der Wahl dennoch eine geeignete Kalibration erstellen zu können. Man sollte jedoch nicht vergessen: Die durch den reduzierten Messaufwand gewonnene Zeit, wird zu einem großen Teil wieder in den mathematischen Aufwand bei der Bildung des Kalibrationsmodells investiert.

III. Zusammenfassung

10. Zusammenfassung der Arbeit

Die NIRS ist inzwischen eine weit verbreitete analytische Methode. Gegenüber den etablierten spektrometrischen und chromatographischen Verfahren weist sie jedoch einen entscheidenden Nachteil auf. Sie ist kein absolutes Messverfahren, weshalb immer zusätzliche, sogenannte orthogonale Methoden zur Ermittlung von Referenzwerten herangezogen werden müssen, um ein geeignetes Kalibrationsmodell für ein vorliegendes Problem zu erstellen.

Die vorliegende Arbeit überprüft und bewertet unterschiedliche Ansätze zur Reduktion des orthogonalen, analytischen Aufwandes bei der Erstellung von Methoden zur Identitäts- und Gehaltsbestimmung mittels NIR, an denen zurzeit mehrere Arbeitsgruppen weltweit forschen.

Zuerst wird gezeigt, dass es mit Hilfe der MCR-ALS mathematisch möglich ist, Reinstoffspektren aus Stoffgemischen herauszurechnen. Allerdings ist dafür ein hinterlegtes Konzentrationsprofil der vorliegenden Substanzen im Gemisch notwendig. Die Konzentrationen der zu analysierenden Substanzen im Gemisch müssen mehr als 10% der Gesamtmasse betragen, um eine zuverlässige Berechnung zu gewährleisten. Um diese Methode als Ersatz für herkömmliche nasschemische Verfahren zur Identifizierung von unbekannten Substanzen oder gar Arzneimittelfälschungen einzusetzen, muss aus den genannten Gründen zwingend eine umfangreiche, im Idealfall alle APIs umfassende Datenbank erstellt werden. In ihr müssen zudem auch die Konzentrationsprofile der Arzneistoffe in gängigen Hilfsstoffen hinterlegt sein. Natürlich müsste zusätzlich bekannt sein in was für einem Hilfsstoffgemisch der Wirkstoff eingebettet ist.

In der pharmazeutischen Industrie wird die NIRS bereits in der Qualitäts- und In-Prozesskontrolle erfolgreich eingesetzt. In einem weiteren entscheidenden Bereich der Qualitätssicherung, nämlich der Stabilitätskontrolle, konnte sich die NIRS aufgrund ihrer inhärenten Einschränkungen bislang jedoch nicht gegen die bestehenden analytischen Methoden durchsetzen. Hier wird vor allem weiterhin mit

III. Zusammenfassung der Arbeit

der HPLC gearbeitet. In der vorliegenden Arbeit konnte gleichwohl demonstriert werden, wie sich die NIR-Spektren von Tabletten während ihrer Alterung verändern. Es wurde ein Kalibrationsmodell entwickelt, welches eine zuverlässig Vorhersage zu dem Alter einer Tablette aus dem vorliegenden Tablettenspektrum erlaubt. Dieses Modell wurde mit Amoxicillin-Tabletten eingehend untersucht.

Dies lässt den Schluss zu, dass dieses analytische Verfahren durchaus auch für die Erstellung von Alterungsmodellen bei festen Arzneiformen mit hohem Wirkstoffanteil genutzt werden kann. Jedoch ist es notwendig, für jedes Arzneimittel jeweils ein eigenes Modell zu erstellen.

Als letztes wurde ein innovativer Ansatz überprüft, der den Kalibrationsaufwand durch die mathematische Erstellung von Tablettenspektren aus exakt gewogenen Pulverspektren drastisch reduziert. Hierbei werden, außer der exakten Einwaage, keine orthogonalen Verfahren zur Kalibration benötigt. Die vorliegende Methode ist geeignet im Rahmen eines von uns ermittelten Vorhersagefehlers ($< 3\%$), die Konzentration des Wirkstoffes in selbstgepressten Tabletten vorhersagen.

Zum Schluss lässt sich sagen, dass keine der in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren und Methoden den Kalibrationsaufwand vollständig eliminieren konnten. Dieser konnte aber zumindest deutlich gesenkt werden. Aus allen Kapiteln der Arbeit wird deutlich, dass eine Reduktion des reinen chemisch-analytischen Aufwandes immer von einem erhöhten mathematischen Aufwand begleitet wird. Da die mathematische Vorbehandlung kein einmaliger Vorgang ist, sondern an jedes neue analytische Problem angepasst werden muss, lässt sich mit der NIRS zurzeit keine signifikante Zeit- und Kostenersparnis gegenüber den klassischen Analysemethoden erzielen.

Trotzdem stellt die NIRS schon jetzt bei bestimmten Anwendungen, wie der online-Wareneingangsprüfung die Methode der Wahl dar. Hier ist eine schnelle und zuverlässige Bestimmung der Identität von Ausgangsstoffen in der Pharmazeutischen Industrie längst schon weit verbreitete Praxis. Weiterhin findet sich die NIRS auch in der in-Prozess-Kontrolle, wo sehr viel Probenmaterial anfällt. Hier benötigt man umgehend eine Auskunft über die Qualität des erzeugten Arzneimittels, wobei eine gründliche Kalibration von großem Vorteil ist. Deshalb besteht auch in Zukunft die Herausforderung darin die Pharmazeutische Industrie und vor allem die zuständigen Behörden von der Kombination der NIRS und neuer mathematischer Ansätze zu überzeugen.

IV. Anhang

11. Instrumentierung und Software

11.1 Nahinfrarotspektrometrie

Alle NIR-Messungen wurden mit dem NIRFlex N-500 Polarisations-FT-NIR-Spektrometer der Firma Büchi durchgeführt.

Dabei wurden die folgenden Bauteile verwendet:

Messungen in diffuser Reflexion:

NIRFlex Solids Messzelle mit einem der folgenden Aufsätze, der je nach Probenbeschaffenheit ausgewählt wurde.

- Tablettenaufsatz (10 Tabletten mit Durchmesser 9mm) mit integrierter externer Referenz
- XL-Aufsatz mit separater externer Referenz
- Aufsatz für 6 Probengefäße (1ml Flachbodenglas, 40 X 8,2mm, Klarglas 8mm PE Stopfen)

10000 bis 4000 cm^{-1} stellt den vermessenen Wellenzahlenbereich dar. Hierbei wurden alle 4 cm^{-1} ein Datenpunkt ermittelt, sodass ein Spektrum aus 1501 Datenpunkten besteht.

Messungen in Transmission:

NIRFlex Solids Transmission Messzelle mit Tablettenaufsatz

(10 Tablettenfächer mit Irisfixierung)

Wellenlängenstandard zur Überprüfung der Wellenlängenrichtigkeit:

Avian Technologies LLC

WC-PP-1920a-01

Cal.#AT-20100324-WC3

Id.No. SG3333 WL

Rep.No. W11053101

11.2 Orthogonale Methoden

Für die analytische Auswertung, speziell für die Gehaltsbestimmung wurden weitere Geräte verwendet.

1. HPLC der Firma Merk-Hitachi®

- Pumpe (Modell L-6200A)
- Manueller Injektor (Modell Rheodyne 7125)
- Probengeber (Autosampler) (Modell 2000A)
- Dioden-Array-Detektor (Modell L-7450)
- Schnittstellenmodul (Interface) (Modell D-6000)

Für die Trennung wurde eine gepackte RP-18 Säule (LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm) der Firma Merck® verwendet.

Für die Aufnahme und Auswertung der Daten wurde die Software „HPLC System Manager“ der Firma Merck-Hitachi® (Modell D-7000, Version 3.1.1.) verwendet.

Alle Peakflächen, die bei den HPLC-Experimenten erhalten wurden, sind auf die tatsächliche Einwaage normiert worden, um sie vergleichbar zu machen. Dazu wurden die Peakflächen durch die dazugehörige genaue Einwaage dividiert, sodass kleine Ungenauigkeiten bei der Einwaage keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Diese Vorgehensweise ist nur im linearen Arbeitsbereich des Detektors erlaubt.

Für die statistischen Auswertungen in allen Kapiteln wurden verschiedene Versionen (2003, 2010beta, 2010) der Software Excel® von der Firma Microsoft® und verwendet.

2. Titrierautomat

Die Gehaltsbestimmung wurde mittels eines Titrierautomats der Firma Metrohm durchgeführt, dieser besteht aus folgenden Bauteilen:

- Titrino (Modell 702 SM)
- Rührer (Modell 728)
- Bürette (Volumen 20ml)

IV. Anhang

- Glaselektrode (Nr. 6.0229.100), mit LiCl in Ethanol befüllt

3. Für die Lagerstabilitätsüberprüfung wurde ein Konstantklimaschrank der Firma Binder, Modell KBF-ICH 240 verwendet.

4. Zur Einstellung von pH-Werten wurde das pH-Meter 632 der Firma Metrohm verwendet.

11.3 Pharmazeutische Technologie

Tablettenpressen

Korsch Excenter, EKO, Berlin

1. Stempel: Durchmesser 9mm, Ober- und Unterseite planar einseitig mit Prägung
2. Stempel Durchmesser 12mm, Ober- und Unterseite planar einseitig ohne Prägung

Mischer

WAB Turbula Type T2C

Erweka AR 400 und AR 402

Bruchfestigkeit

Model 5Y Tablettester, Dr. Schleuniger

12. Reagenzien

Tab. 12.1: verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Aerosil 200	Degussa AG, Düsseldorf, Deutschland
Ciprofloxacin	Firmenleihgabe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Hypromellose	Caesar & Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland
Ibuprofen	Caesar & Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Kalziumhydrogenphosphat	Caesar & Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland
Maisstärke	Cargill, Krefeld, Deutschland
Microkristalline Cellulose	J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Tablettose	Meggle GmbH & Co.KG, Wasserburg, Deutschland
Talkum	Lucenac Group, Toulouse, Frsnkreich

13. Literatur

- [1] Radtke G, Knop K, Lippold BC., Near Infrared (NIR) Spectroscopy. Fundamentals and Application from a Pharmaceutical Point of View., Pharm Ind 9 (1999) 848–857.
- [2] W. Herschel, Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun. By William Herschel, LL. D. F. R. S, Philosophical Transactions of the Royal Society of London 90 (1800) 284–292.
- [3] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, Handbook of near-infrared analysis, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [4] W. Plugge, van der Vlies, C, Near-infrared spectroscopy as an alternative to assess compliance of ampicillin trihydrate with compendial specifications, J Pharm Biomed Anal 11 (1993) 435–442.
- [5] E.W. Ciurczak, D.J. Bornhop, D.A. Dunn, Mariella, Jr., Raymond P., C.J. Murphy, D.V. Nicolau, S. Nie, M. Palmer, R. Raghavachari, in: International Symposium on Biomedical Optics, San Jose, CA, SPIE, 2002, pp. 116–125.
- [6] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, de la Pezuela, C., Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry, Analyst 123 (1998) 135R.
- [7] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden; mit 70 Tabellen, 2nd ed., Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, 1992.
- [8] J. Workman, L. Weyer, Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy, CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [9] H. Böhme, Arzneibuch-Kommentar: Wissenschaftliche Erläuterungen zum Arzneibuch, Wiss. Verl.-Ges. [u.a.], Stuttgart.
- [10] P. Kubelka, F. Munk, Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche, Zeitschrift f. Techn. Physik (1931) 593–601.
- [11] H. Günzler, H.-U. Gremlich, IR-Spektroskopie: Eine Einführung, 4th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [12] NIRCAL Manual Version 3.0, Manual, Büchi Labortechnik AG, CH-Flawil, NIRCAL Manual.
- [13] <http://www.buchi.com/de-de/products/nirsolutions/nirflex-n-500> (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).

IV. Anhang

- [14] Europäisches Arzneibuch 7. Ausgabe: Amtliche deutsche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag, 2011.
- [15] Europäisches Arzneibuch, 6. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, 2009.
- [16] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [17] U.R. Kunze, G. Schwedt, Grundlagen der quantitativen Analyse, 6th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [18] P. Rohdewald, G. Rücker, Analytische Verfahren des Europäischen Arzneibuches. Bd. 1 - 3 und des Deutschen Arzneibuches. 8 Ausgabe, Deutscher Apotheker Vlg, 1990.
- [19] U. Tinner, Elektroden in der Potentiometrie, Metrohm.
- [20] G. Jander, K.F. Jahr, G. Schulze, J. Simon, Maßanalyse: Theorie und Praxis der Titrations mit chemischen und physikalischen Indikationen, 16th ed., de Gruyter, Berlin [u.a.], 2003.
- [21] S. Ebel, W. Parzefall, Experimentelle Einführung in die Potentiometrie, Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
- [22] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, Chemometrik: Grundlagen und Anwendung, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2001.
- [23] H.W. Siesler, Near-infrared spectroscopy: Principles, instruments, applications, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [24] W. Kessler, Multivariate Datenanalyse: Für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [25] A. Savitzky, M. Golay, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, Anal. Chem. (1964) 1627–1639.
- [26] T. Isaksson, T. Næs, The Effect of Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy, appl spectrosc 42 (1988) 1273–1284.
- [27] I.T. Jolliffe, Principal component analysis, 2nd ed., Springer, New York, NY [u.a.], 2002.
- [28] U. Schmid, Entwicklung chemometrischer Methoden für die Klassifikation von Bakterien mittels Mikro-Raman-Spektroskopie, Braunschweig, 2009.

IV. Anhang

- [29] C. Weihs, J. Jessenberger (Eds.), Statistische Methoden zur Qualitätssicherung und -optimierung, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 1998.
- [30] D.P. Berrar, W. Dubitzky, M. Granzow, A practical approach to microarray data analysis: Singular Value Decomposition and Principal Component Analysis, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 2003.
- [31] K. Backhaus, B. Erichson, W. Plinke, R. Weiber, Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung, Springer, Berlin, 2010.
- [32] H. Wold, Causal flows with latent variables: Partings of the ways in the light of NIPALS modelling, European economic review EER 5 (1974) 67–86.
- [33] R.W. Gerlach, B.R. Kowalski, Wold, Herman O. A, Partial Least Squares Path Modelling with Latent Variables, Defense Technical Information Center, Ft. Belvoir, 1979.
- [34] H. Wold, Path Models with latent variables: The NIPALS approach, Acad. Pr, New York, ca. 1975.
- [35] R.A. Fisher, The use of multiple measurements in taxonomic problems, Annals of eugenics, 1936.
- [36] R. Henrion, G. Henrion, Multivariate datenanalyse: Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten, Springer-Verlag, Berlin [etc.], 1995.
- [37] R.O. Duda, P.E. Hart, D.G. Stork, Pattern classification, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.
- [38] T. Næs, T. Isaksson, Selection of samples for calibration in near-infrared spectroscopy. Part I: General principles illustrated by example, Applied Spectroscopy 43 (1989) 328–335.
- [39] T. Isaksson, T. Næs, Selection of samples for calibration in near-infrared spectroscopy. Part II. Selection based on spectral measurements, Applied Spectroscopy 44 (1990) 1152–1158.
- [40] D.M. Hawkins, S.C. Basak, D. Mills, Assessing model fit by cross-validation, J Chem Inf Comput Sci 43 (2003) 579–586.
- [41] S. Wold, Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models, Technometrics 20 (1978) 397–405.
- [42] Lachenbruch, Peter A. Mickey, M. Ray, Estimation of Error Rates in Discriminant Analysis, 1968.

IV. Anhang

- [43] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 76 (2005) 101–110.
- [44] www.mcrals.info. (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).
- [45] W. Kessler, R. Kessler, Multivariate Curve Resolution - Integration von Wissen in Chemometrische Modelle, *Chemie Ingenieur Technik* 82 (2010) 441–451.
- [46] T. Azzouz, R. Tauler, Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples, *Talanta* 74 (2008) 1201–1210.
- [47] H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler, Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-IV Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis, *Talanta* 33 (1986) 943–951.
- [48] R. Tauler, Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 30 (1995) 133–146.
- [49] R. Tauler, A. Smilde, B. Kowalski, Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution, *J. Chemometrics* 9 (1995) 31–58.
- [50] M. Amrhein, B. Srinivasan, D. Bonvin, M.M. Schumacher, On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 33 (1996) 17–33.
- [51] R. Tauler, Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution, *J. Chemometrics* 15 (2001) 627–646.
- [52] M. Blanco, A. Peguero, Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1127–1136.
- [53] M. Blanco, A. Peguero, Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy, *J Pharm Biomed Anal* 52 (2010) 59–65.
- [54] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070287.pdf> (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).

IV. Anhang

- [55] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html> (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).
- [56] K.A. Bakeev, Process analytical technology: Spectroscopic tools and implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries, 2nd ed., Wiley, Chichester, West Sussex, 2010.
- [57] M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalá, Preparing calibration sets for use in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy, Journal of pharmaceutical sciences 97 (2008) 1236–1245.
- [58] www.ich.org. (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).
- [59] www.gphf.org/web/de/minilab/hintergrund_antimalarials_africa_1997.htm. (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).
- [60] <http://www.gphf.org/web/de/minilab/index.htm> (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).
- [61] J. Petri, M. Tawab, NIR zur Qualitätssicherung von Fertigarzneimitteln, Deutsche Apotheker Zeitung (2004).
- [62] P.J. Gemperline, E. Cash, Advantages of soft versus hard constraints in self-modeling curve resolution problems. Alternating least squares with penalty functions, Anal. Chem. 75 (2003) 4236–4243.
- [63] Joaquim Jaumot, Raimundo Gargallo, Anna de Juan, Roma Tauler, A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB, Elsevier, 2005.
- [64] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-data-package-for-registration-applications-in-climatic-zones-iii-and-iv.html> (zuletzt abgerufen am 05.02.2015).
- [65] G. Dünnebier, H. Tups, FDA PAT Initiative – Eine Anwendersicht zu technischen Möglichkeiten und aktueller industrieller Umsetzung, Chemie Ingenieur Technik 79 (2007) 2019–2028.
- [66] Herkert, T. Volker, Evaluation of a new near-infrared spectroscopy methode for identification of pharmaceutical products on the packaging line, available at <https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/handle/10900/48158> (zuletzt abgerufen am 13.12.2014).

IV. Anhang

- [67] R.P. Cogdill, C.A. Anderson, M. Delgado, R. Chisholm, R. Bolton, T. Herkert, A.M. Afnan, J.K. Drennen, Process analytical technology case study: part II. Development and validation of quantitative near-infrared calibrations in support of a process analytical technology application for real-time release, AAPS PharmSciTech 6 (2005) E273-83.
- [68] M.W. Derksen, van de Oetelaar, Piet J.M., F.A. Maris, The use of near-infrared spectroscopy in the efficient prediction of a specification for the residual moisture content of a freeze-dried product, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 17 (1998) 473–480.

14. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Daphny Kaminski, Graber
Geburtsdatum:	07. Mai 1983
Geburtsort:	Gifhorn
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit März 2013	Apothekerin in der Apotheke Hohenhameln in Hohenhameln (Inh.: Apothekerin S. Tremel)
Okt. 2012 – Feb. 2013	Apothekerin in der Rats-Apotheke in Lehrte. (Inh.: Apothekerin B. Drückler)
Juni 2008 – Jan. 2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig.
Mai 2008 – Okt. 2012	Apothekerin in der Tannen-Apotheke in Braunschweig (Inh.: Apothekerin S. Lindenberg)
Mai 2008	Approbation als Apothekerin.
Nov. 2007 – April 2008	zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung: Schaper & Brümmer GmbH u. Co. Kg
Mai 2007 – Okt. 2007	erster Abschnitt der praktischen Ausbildung: Spitzweg-Apotheke in Braunschweig. (Inh.: Apothekerin Dr. S. Brandt)

Hochschul- und Schulbildung

Okt. 2002 – März. 2007	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Braunschweig.
Aug. 1995 – Jun. 2002	Gymnasium Hankensbüttel
Sep. 1993 – Mai 1995	Orientierungsstufe in Wesendorf
Feb. 1989 – Jul. 1993	Grundschule in Wesendorf